

Charakterisierung von B-Zellen und Plasmazellen im Kontext einer chronischen *Helicobacter pylori*-Infektion

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Laura Anne Neumann, M.Sc.

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Thomas F. Meyer
2. Prof. Dr. Dr. Thomas Schneider
3. Dr. Anton Aebischer

Tag der mündlichen Prüfung: 22. März 2018

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
3. EINLEITUNG	7
3.1. Pathogenese der <i>Helicobacter pylori</i> -Infektion	7
3.1.1. Epidemiologie	7
3.1.2. <i>H. pylori</i> -assoziierte Erkrankungen.....	7
3.1.3. Pathogenitätsfaktoren von <i>H. pylori</i>	8
3.1.4. Immunantwort auf eine Infektion mit <i>H. pylori</i>	10
3.1.5. Die Rolle von iNOS und Stickstoffmonoxid während einer <i>H. pylori</i> -Infektion ..	14
3.2. B-Lymphozyten und die humorale Immunantwort	15
3.2.1. Der B-Zellrezeptor	15
3.2.2. Die Diversität des B-Zell-Repertoires	18
3.3. Vorarbeiten zu dieser Arbeit	23
3.4. Zielsetzung	25
4. MATERIAL UND METHODEN	27
4.1. Material	27
4.1.1. Technische Geräte	27
4.1.2. Verbrauchsmaterialien	27
4.1.3. Chemikalien	28
4.1.4. Puffer und Medien.....	30
4.1.5. Kommerzielle Komplettsysteme	31
4.1.6. Antikörper	32
4.1.7. Primer	34
4.1.8. Organismen und Plasmide.....	36
4.1.9. Software	37
4.2. Methoden.....	38
4.2.1. Patienten und Proben.....	38
4.2.2. Zellkultur	38
4.2.3. Immunhistochemische Färbungen.....	41
4.2.4. Phänotypisierung humaner B-Zellen und Plasmazellen mittels Durchflusszytometrie	43
4.2.5. Quantitative real-time PCR zum Messen von Zytokin-mRNA Level	45
4.2.6. Molekularbiologische Untersuchung des Immunglobulin-Repertoires humaner Plasmazellen mittels Einzelzell-Reverse Transkription-PCR	47

4.2.7. Herstellung monoklonarer rekombinanter Antikörper aus einzelnen humanen Plasmazellen.....	51
4.2.8. Charakterisierung der rekombinanten Antikörper mittels ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay).....	55
4.2.9. Charakterisierung der rekombinanten Antikörper mittels Western-Blot-Analyse.	56
4.2.10. Statistik.....	57
5. ERGEBNISSE.....	58
5.1. Phänotypische Charakterisierung von B-Zellen und Plasmazellen im Kontext einer chronischen <i>H. pylori</i> -Infektion	58
5.1.1. Verteilung von B-Zell-Subtypen im Blut und Gewebe.....	58
5.1.2. Analyse der Immunglobuline in der Magenmukosa und im Serum <i>H. pylori</i> -infizierter Patienten	61
5.1.3. Starke Infiltrierung iNOS-exprimierender Plasmazellen in der Magenmukosa <i>H. pylori</i> -infizierter Patienten	63
5.1.4. Enzymatisch aktives iNOS in mukosalen Plasmazellen <i>H. pylori</i> -infizierter Patienten.....	64
5.1.5. Mukosale iNOS ⁺ Plasmazellen fehlen in anderen gastrointestinalen Infektionskrankheiten.....	65
5.1.6. iNOS-exprimierende B-LZL sind stark aktiviert und produzieren Interferon-γ	66
5.1.7. Pro- und anti-inflammatorische Zytokinlevel in Seren und Biopsieüberständen <i>H. pylori</i> -infizierter Patienten und Kontrollen	67
5.1.8. Mukosale iNOS-exprimierende memory B-Zellen und Plasmazellen <i>H. pylori</i> -infizierter Patienten produzieren pro- und anti-inflammatorische Zytokine.....	69
5.2. Molekularbiologische Charakterisierung mukosaler Plasmazellen im Kontext einer chronischen <i>H. pylori</i> -Infektion	71
5.2.1. iNOS-exprimierende Plasmazellen zeigten ein hohes Vorkommen des IgA1 Isotypen	72
5.2.2. Vergleichbare Nutzung der V _H - und J _H -Gensegmente in iNOS ⁺ und iNOS ⁻ Plasmazellen.....	73
5.2.3. Ähnliche Häufigkeit und Verteilung somatischer Hypermutationen in V _H -Regionen der iNOS ⁺ und iNOS ⁻ Plasmazellen	77
5.2.4. Ähnliche Verteilung der CDRH3-Längen in iNOS ⁺ und iNOS ⁻ Plasmazellen	81
5.2.5. Klonalität.....	82
5.3. Generierung rekombinanter Antikörper einzelner mukosaler Plasmazellen im Kontext einer chronischen <i>H. pylori</i> -Infektion	84
5.3.1. Klonierung der variablen Regionen der leichten und schweren Antikörperketten	84
5.3.2. Transfektion eukaryotischer Zellen und Reinigung der rekombinanten Antikörper	86

5.3.3. Reaktivität der rekombinanten Antikörper mit <i>H. pylori</i> Antigenen	88
5.3.4. Polyreaktivität der rekombinanten Antikörper	90
6. DISKUSSION	92
6.1. Phänotypische Charakterisierung der B-Zellen und Plasmazellen im Kontext einer chronischen <i>H. pylori</i> -Infektion	92
6.2. Molekularbiologische Charakterisierung des IgH-Repertoires mukosaler Plasmazellen im Kontext einer chronischen <i>H. pylori</i> -Infektion	95
6.2.1. Verteilung der Immunglobulin-Isotypen	96
6.2.2. Analyse der V _H -, und J _H -Gen-Nutzung	97
6.2.3. Mutationsanalyse	99
6.2.4. Analyse der CDRH3-Längen und Klonalität	100
6.2.5. Zusammenfassung hinsichtlich des IgH-Repertoires	101
6.3. Generierung rekombinanter Antikörper einzelner mukosaler Plasmazellen im Kontext einer chronischen <i>H. pylori</i> -Infektion	102
6.4. Ausblick	105
7. LITERATURVERZEICHNIS	107
8. ANHANG	123
8.1. Abbildungsverzeichnis	123
8.2. Tabellenverzeichnis	125
Eidestattliche Erklärung	127

1. ZUSAMMENFASSUNG

Helicobacter pylori ist ein humanpathogenes Bakterium, das den menschlichen Magen kolonisiert und dadurch eine Immunantwort des Wirts induziert, welche hauptsächlich von Th1-vermittelten Entzündungsreaktionen geprägt ist. Statt eine vollständige Eradikation von *H. pylori* durch die Immunreaktion zu erreichen, kommt es normalerweise zu einer lebenslangen Persistenz des Bakteriums und die chronische Infektion kann Gastritis, Magengeschwüre und Magenkarzinome verursachen. Interessanterweise kommt es infolge einer Infektion zu einer Hochregulation der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), aber die zellulären Quellen und zugrundeliegenden Mechanismen von iNOS sind noch nicht vollständig verstanden. Der iNOS-abhängigen Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) können sowohl antimikrobielle als auch pathologische Eigenschaften zugeschrieben werden. Es ist dennoch unklar, ob die iNOS-Induktion das Resultat einer *H. pylori*-assoziierten neoplastischen Veränderung oder eine generelle Eigenschaft während gastrointestinaler Infektionen ist. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit iNOS-exprimierende Plasmazellen (PZ) aus der Magenmukosa *H. pylori*-infizierter Patienten isoliert und phänotypisch, vor allem mittels Durchflusszytometrie und molekularbiologisch hinsichtlich ihres Immunglobulin-Repertoires untersucht. Es wurde erstmals gezeigt, dass mukosale IgA-sezernierende PZ eine der wesentlichen iNOS⁺ Zelltypen während einer *H. pylori*-Infektion im Menschen darstellen und zusätzlich wurde ihre intrazelluläre NO-Produktion nachgewiesen. Da iNOS⁺ PZ in weiteren gastrointestinalen Infektionskrankheiten fehlten, scheint dies kein genereller Phänotyp von PZ der mukosalen Immunabwehr zu sein. Die Analyse der intrazellulären Zytokin-Expression der mukosalen B-Zellpopulationen in *H. pylori*-Patienten ergab eine Ko-Expression von IFN- γ und TNF- α in iNOS⁺ *memory* B-Zellen und eine TNF- α -Expression in iNOS⁺ PZ, aber nicht in den iNOS⁻ Zellen.

Die molekularbiologische Charakterisierung des Immunglobulin-Repertoires von iNOS⁺ und iNOS⁻ PZ, isoliert aus drei Patienten, und der Vergleich von 149 Sequenzen der V_HDJ_H-Regionen ergab keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Isotyp-Verteilungen, der Nutzung der V_H- und J_H-Segmente, CDRH3-Längen sowie somatischen Mutationen innerhalb der variablen Antikörperregion. Nur vereinzelt kamen klonal verwandte Zellen vor und alle Antikörper zeigten typische Charakteristika einer T-zellabhängigen Affinitätsreifung.

In Voruntersuchungen konnte eine erhöhte Dichte iNOS⁺ PZ in Individuen gezeigt werden, die eine experimentelle *H. pylori*-Infektion überwinden konnten, im Unterschied zu denen die nicht in der Lage waren. Daher wurden Antikörper der iNOS⁺ PZ eines Patienten rekombinant in HEK-293T Zellen hergestellt und deren Spezifität gegen *H. pylori*-Antigene und weitere

Antigene mittels Immunassays getestet. Elf Antikörper wurden erfolgreich hergestellt, wobei zwei der Antikörper spezifisch *H. pylori*-Antigene, den Virulenzfaktor VacA sowie ein bisher unbekanntes lösliches Protein, gebunden haben.

Zusammenfassend ist die iNOS-Expression bereits in B-Zellen nachzuweisen und korreliert mit der Expression von IFN- γ und TNF- α , welche vermutlich die iNOS-Expression in autokriner/parokriner Weise regulieren. Die Präsenz dieser pro-inflammatorischen Zytokine könnte in Verbindung mit *H. pylori*-induzierten Signalen die iNOS-Expression in PZ aufrechterhalten.

Diese Ergebnisse weisen auf eine offensichtlich bedeutsamere Rolle der B-Zellpopulationen bei der Abwehr einer *H. pylori*-Infektion hin, als bisher angenommen. Diese Aspekte könnten besonders zur Entwicklung neuer Impfmethoden und therapeutischer Strategien beitragen.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a human-pathogenic bacterium that colonizes the human stomach and thereby initiates host immune response, which is mainly characterized by Th1-mediated inflammatory reactions. Instead of a complete eradication of *H. pylori* by the induced immune response, a lifelong bacterial persistence leads to chronic infections that may result in ulceration, atrophy and carcinogenesis. Interestingly, up-regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) has been observed in gastric mucosal tissue during the course of *H. pylori* infection in humans, however the cellular sources and underlying mechanisms of iNOS induction are not fully understood. iNOS-dependent production of nitric oxide (NO) is one of the factors commonly linked to both, anti-microbial immunity and pathology. It is, however, unclear whether iNOS induction is a result of *H. pylori*-associated neoplastic changes or a general feature during gastrointestinal infections. Therefore, in this thesis iNOS-expressing plasma cells (PCs) in the stomach mucosa of *H. pylori*-infected patients were isolated and phenotypically analyzed by flow cytometry, as well as screened using molecular techniques regarding their immunoglobuline (Ig) repertoires. For the first time, we identified mucosal IgA-producing PCs as a major iNOS⁺ cell population during *H. pylori* infection in humans, and additionally confirmed their intracellular nitric oxide production. Since iNOS⁺ PCs were not detectable in other gastrointestinal infectious diseases, this reaction does not seem to be a general feature of mucosal PCs under conditions of infection. Additionally, intracellular cytokine expression analyses of mucosal B-lineage cells isolated from *H. pylori* patients revealed a co-expression of IFN- γ and TNF- α in iNOS⁺ memory B cells and the expression of TNF- α in iNOS⁺ PCs, but not in iNOS⁻ cells.

Molecular analysis of the Ig repertoire of iNOS⁺ and iNOS⁻ PCs isolated from three patients and comparison of 149 corresponding sequences reflecting the V_HDJ_H regions revealed no significant differences regarding the Ig isotype composition, V_H and J_H gene family usage, CDRH3 length, and frequency of somatic mutations within the variable antibody region. Only a small number of clonally related cells were detectable and all antibodies were characterized by typical properties of T cell-dependent affinity maturation.

Preliminary investigations revealed that the number of mucosal iNOS⁺ PCs was increased in individuals who were able to eradicate experimental *H. pylori* infection compared to those who were not. Thus, we recombinantly expressed antibodies of patient-derived iNOS⁺ PCs in HEK-293T cells and investigated their specificity towards *H. pylori* antigens and other antigens by immunoassays. Eleven antibodies were successfully expressed, whereby two of

them specifically recognized and bound to *H. pylori* antigens, the virulence factor VacA and an unknown soluble protein.

Taken together, iNOS expression is already detectable in B cells and correlates with the expression of IFN- γ and TNF- α , which might regulate the iNOS expression in an autocrine/paracrine manner. The presence of these pro-inflammatory cytokines in combination with *H. pylori*-induced signals could maintain the iNOS expression in PCs.

These results indicate an obviously greater importance of B cell populations during immune response induced by *H. pylori* infection than previously assumed. Hence, these aspects could especially contribute to the development of novel vaccination techniques and therapeutic strategies.

2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AID	aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
APRIL	engl. <i>a proliferation-inducing ligand</i>
BZR	B-Zellrezeptor
bp	Basenpaare
B-LZL	B-lymphoblastoide Zelllinie
BZ	B-Zelle(n)
CD	engl. <i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	engl. <i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CDR	engl. <i>complementary determining regions</i>
CDRH	CDR der IgH-Kette
C _H	konstante Domäne einer schweren Immunglobulinkette
C _L	konstante Domäne einer leichten Immunglobulinkette
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanine
CSR	Klassenwechsel-Rekombination (<i>Class switch recombination</i>)
D	Diversitäts (<i>diversity</i>)- Gensegment einer schweren Immunglobulinkette
DA	Dalton
DAF-FM	4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorfluorescein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ELISA	engl. <i>Enzyme Linked Immunosorbent assay</i>
FACS	fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoreszein-5-isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i>)
FWR	engl. <i>Framework region</i>
GF	Gesichtsfeld
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgH	Ig schwere Kette
IgL	Ig leichte Kette
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
J _H	<i>Joining</i> -Gensegment einer schweren Immunglobulinkette
J _L	<i>Joining</i> -Gensegment einer leichten Immunglobulinkette

LPL	Lamina propria Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
mBZ	<i>memory</i> B-Zelle(n), Gedächtnis-B-Zelle
MHC	engl. <i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	Boten-(engl. <i>messenger</i>) Ribonukleinsäure
NK	Natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
OD X nm	Optische Dichte bei Wellenlänge X nm
PAMPs	engl. <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salinelösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	R-Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin Cyanin 7
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	post-infection
PMN	Polymorphnukleäre Zellen
PZ	Plasmazelle(n)
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
R	<i>Replacement</i> -Mutation, Austauschmutation
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S	<i>Silent</i> -Mutation, stille Mutation
SHM	Somatische Hypermutation
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter</i>)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-Ethylendiamintetraacetat
Th	T-Helfer, z.B. Th1 (proinflammatorisch) und Th2 (antiinflammatorisch)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
V _H	variable Domäne bzw. Gensegment einer schweren Immunglobulinkette
V _L	variable Domäne bzw. Gensegment einer leichten Immunglobulinkette

3. EINLEITUNG

3.1. Pathogenese der *Helicobacter pylori*-Infektion

3.1.1. Epidemiologie

Helicobacter pylori ist ein gramnegatives, mikroaerophiles, pathogenes Bakterium, das auf Grund seiner lophotrichen Begeißelung sehr beweglich ist. Das Bakterium besiedelt vornehmlich die Antrumregion des menschlichen Magens (1, 2). Die Infektion mit *H. pylori* ist weltweit verbreitet und die Ursache einer der häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen. Insgesamt sind etwa 50 % der Weltbevölkerung mit dem Keim infiziert, wobei die Prävalenz der Infektion in verschiedenen Ländern und auch unter der Bevölkerung desselben Landes sehr variiert (3, 4) und stark mit sozio-ökonomischen Faktoren, wie Dichte des Zusammenwohnens, hygienischen Verhältnissen und möglicherweise auch der genetischen Prädisposition korreliert (5, 6). Eine Infektion mit *H. pylori* findet meist in der frühen Kindheit statt und persistiert unbehandelt für gewöhnlich ein Leben lang (7-9). In experimentellen Infektionsmodellen konnte in einigen wenigen Fällen eine Selbstlimitation der *H. pylori*-Infektion gezeigt werden (10). Die *H. pylori*-Infektion erfolgt in der Regel auf fäkal-oralem oder oral-oralem Wege (11). Die Diagnose basiert meist auf einem indirekten ¹³C-Harnstoff-Atemtest sowie einem direkten Nachweis durch eine Gastroskopie und Probenentnahme (Biopsien) gefolgt von einer Warthin-Starry Silberfärbung eines Biopsieschnittes (12). Die Behandlung besteht aus einer Kombination von zwei verschiedenen Antibiotika mit einem Protonenpumpenhemmer und ist in den meisten Fällen erfolgreich, jedoch kommt es zunehmend zu Resistenzentwicklungen (13, 14). Aktuelle Forschungen fokussieren sich daher auf die Entwicklung eines effektiven Impfstoffes, der sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch eingesetzt werden könnte (15). Ein zuverlässiger Impfstoff steht derzeit noch nicht zur Verfügung (16, 17). Eines der Probleme besteht darin, dass zwar alle Infizierten eine Immunantwort gegen das Bakterium zeigen, diese aber in der Regel nicht ausreicht den Keim zu eliminieren (18).

3.1.2. *H. pylori*-assoziierte Erkrankungen

Obwohl eine *H. pylori*-Infektion häufig klinisch asymptomatisch bleibt (19), kann eine chronische Infektion durch eine persistierende Inflammation zu verschiedenen *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen führen. Die klinischen Folgen sind sehr variabel und hängen von bakteriellen und wirtsspezifischen Faktoren ab, aber auch von dem Ort, an dem sich die Entzündung vorwiegend abspielt (20). Etwa 10-15 % der Patienten zeigen Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre, und ca. 1-2 % haben schwere Komplikationen wie

Adenokarzinome oder B-Zell-Lymphome des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) (21-23). Aus diesem Grund wurde *H. pylori* durch die Weltgesundheitsorganisation WHO (24) als Karzinogen der Klasse 1 eingestuft. Das MALT-Lymphom ist eine lymphoproliferative Erkrankung, bei der *H. pylori* als Antigen die monoklonale Proliferation der B-Lymphozyten stimuliert. Diese MALT-Lymphome sind in der Anfangsphase *Helicobacter*-Antigen getrieben, d.h., ein Großteil der MALT-Lymphom-Patienten kann in einem frühen Stadium durch eine Eradikation der Infektion geheilt werden (25-28).

Die funktionellen Mechanismen, die dem Beitrag von *H. pylori* zu diesen Erkrankungen zu Grunde liegen, sind Gegenstand aktueller Forschung. Die Kolonisierung mit *H. pylori* führt zu einer lebenslangen proinflammatorischen Immunantwort, die mit einer entsprechenden Zellschädigung gekoppelt ist. Sie führt letztendlich zu einem Verlust der normalen Architektur der Magenmukosa. Dabei kommt es durch die kontinuierliche Produktion von Radikalen (oxidativer und nitrosativer Stress) zu einem erhöhten Risiko einer Schädigung der DNA und gestörten DNA-Reparaturmechanismen (29-31). Diese Ereignisse können Hypermethylierungen oder Mutationen von Tumorsuppressor-Genen oder die Aktivierung von Signalwegen gefolgt von einer chromosomalen Translokation beinhalten und damit die Entstehung von Tumoren begünstigen (32).

3.1.3. Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori*

H. pylori besitzt eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren, die es dem Bakterium ermöglichen, die gastrische Nische erfolgreich zu besiedeln (Tabelle 3-1). Nach der oralen Aufnahme müssen die Bakterien für kurze Zeit im sauren Milieu des Magenumens überleben, bevor sie das fast neutrale Milieu des epithelnahen Magenschleims erreichen. Obwohl *H. pylori* nicht acidophil ist, vermag das Bakterium durch die Sekretion des Enzyms Urease der Säure des Magens für kurze Zeit zu widerstehen. Diese enzymatische Reaktion basiert auf der Spaltung von Harnstoff in Ammonium und CO₂ (33). Ammonium dient dem Bakterium einerseits als Puffer gegen den niedrigen pH-Wert, andererseits stellt es eine Stickstoffquelle für dessen Aminosäuresynthese dar (34, 35).

Unter Einsatz seiner 4-6 unipolaren Flagellen überwindet *H. pylori* die viskose Schleimschicht des Magens und schwimmt in Richtung der pH-neutralen Mukosa (36). Die Orientierung erfolgt dabei entlang des steigenden pH-Wertes mittels Chemotaxis (37). In der Mukosa angekommen kann sich *H. pylori* mit Hilfe verschiedener Adhäsionsmoleküle an die Epithelzellen anheften. Es gibt eine Vielzahl von bakteriellen Faktoren, die die Adhäsion vermitteln, Beispiele dafür sind die Adhärenz-assoziierten Lipoproteine A und B (AlpA,

AlpB), das Lewis b Blutgruppen Antigen-bindendes Adhäsion A2 (BabA2), das proinflammatorische äußere Membranprotein A (*outer inflammatory protein*, OipA) und das Sialinsäure-bindende Adhäsion A (SabA) (38-41). Der durch Adhäsion vermittelte Kontakt zwischen Bakterien und Wirtszelle ist eine Voraussetzung für weitere pathogene Prozesse. Zwei weitere Pathogenitätsfaktoren von *H. pylori* sind die Enzyme Katalase (KatA) und Superoxid Dismutase (SodB), welche reaktive Sauerstoffverbindungen eliminieren, die durch eine aktive Immunantwort gebildet werden (42, 43).

Tabelle 3-1 Ausschnitt von *H. pylori* Pathogenitätsfaktoren

Virulenzfaktor	Funktion	Verbreitung	Referenz
Urease	Puffern der Magensäure	alle Stämme	(33, 34)
Flagellen	Motilität	alle Stämme	(36)
AlpA und -B (<i>adherence-associated lipoprotein</i>)	Anheftung an Wirtszellen	alle Stämme	(39)
BabA2	Adhäsion für Leb (Lewis b Blutgruppen Antigen)	Typ I Stämme	(38)
OipA (<i>outer inflammatory protein</i>)	Anheftung an Wirtszellen	alle Stämme	(41)
SabA (<i>sialic acid binding adhesin</i>)	Anheftung an Sialylsäure Glykokonjugat Lewis x	alle Stämme	(40)
KatA (Katalase) und SodB (Superoxid Dismutase)	Schutz gegen oxidativen Stress hervorgerufen durch eine aktive Immunantwort	alle Stämme	(42, 43)
VacA	vakuolisierendes Zytotoxin	alle Stämme	(44)
CagA	Immundominantes Antigen	Typ I Stämme	(45)

Neben vielen weiteren besitzt *H. pylori* zwei besonders gut untersuchte Virulenzfaktoren, die für die Pathogenese der Infektion entscheidend sind: das vakuolisierende Zytotoxin A (VacA) und das Zytotoxin-assoziierte Antigen A (CagA). Anhand klinischer Studien konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit VacA- und CagA-positiven *H. pylori*-Stämmen mit einem erhöhten Vorkommen von peptischen Ulzera und Magenkarzinomen assoziiert ist (46-48). Je nach Vorhandensein dieser Virulenzfaktoren werden *H. pylori*-Isolate in Typ I (CagA und VacA-positiv) und Typ II (CagA und VacA-negativ) Stämme unterteilt (49).

Obwohl fast alle *H. pylori*-Stämme das *vacA*-Gen besitzen, wird das Protein nur von ungefähr der Hälfte aller Stämme sezerniert (50). VacA ist ein 87 kDa großes porenbildendes Toxin, das in vitro zu einer starken Vakuolisierung von Epithelzellen führt (51, 52). Das Protein ist in der Lage, in das Zytosol vorzudringen und in den betroffenen Zellen Apoptose durch Porenbildung in mitochondrialen Membranen auszulösen (53-55). Zusätzlich führt die Porenbildung in Epithelzellen zu einer erhöhten transzellulären Permeabilität und führt damit

zum erhöhten Austritt von Harnstoff und Anionen in das Lumen. Dieser Effekt ist abhängig vom Zelltyp und könnte auf Magenepithelzellen, wie beispielsweise Belegzellen, beschränkt sein. Dadurch käme es zu einer verminderten Produktion von Magensäure (56, 57). Das sezernierte VacA kann allerdings auch in tiefere Gewebeschichten vordringen, um dort mit verschiedenen Immunzellen wie Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zu interagieren. Dies führt zu einer Inhibition der Antigenpräsentation und einer verminderten T-Zell Proliferation (52, 58, 59).

Genetische Untersuchungen konnten zeigen, dass das *cagA*-Gen Teil eines ca. 40 kb großen Abschnittes auf dem Bakterienchromosom ist und dass dieses DNA-Segment ursprünglich von einem anderen Organismus stammt, welches durch horizontalen Gentransfer ins *H. pylori*-Genom gelangt ist (60, 61). Dieser Abschnitt hat für die Virulenz von *H. pylori* eine wichtige Bedeutung und wird als *cag*- (*cytotoxin-associated genes*) Pathogenitätsinsel (PAI) bezeichnet. Diese *cag*-PAI kodiert für ein Typ IV-Sekretionssystem (T4SS), durch welches das 128 kDa große Effektorprotein CagA in die Magenepithelzellen injiziert wird (45, 62). Sobald CagA in die Zelle eingedrungen ist, wird es phosphoryliert und führt zur Reorganisation des Zytoskeletts und zu Veränderungen der Zellmorphologie (63-66). Die *cag*-PAI beeinflusst auch die Immunreaktion, da sie in der Lage ist, in T-Zellen Apoptose auszulösen (67). Durch die Interaktion der Typ-IV-Struktur mit der Wirtszelle kommt es zu einer Induktion von proinflammatorischen Zytokinen in Epithelzellen (64, 68).

3.1.4. Immunantwort auf eine Infektion mit *H. pylori*

Die Mukosa des Gastrointestinaltraktes beherbergt ein Netzwerk des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Dieses ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Homöostase und dem Schutz vor Infektionskrankheiten, verursacht aber auch pathologische Prozesse des Gastrointestinaltraktes. Die Mukosa im Magen ist die am wenigsten mit Bakterien besiedelte Region des Gastrointestinaltraktes, dank der effizienten Barrierefunktionen, wie der Mukusproduktion, der Peristaltik sowie der schnellen epithelialen Zellerneuerung und vor allem dem niedrigen pH-Wert im Lumen. Diese Barrieren sind sehr effizient und im Unterschied zum Darm gibt es im Magen keine lymphatischen Gewebestrukturen und nur vereinzelt Immunzellen (69). Dennoch führt die Infektion mit *H. pylori* zu einer komplexen Immunantwort. Es kommt zu einer lokalen Entzündungsreaktion und einem Anstieg proinflammatorischer Zytokinkonzentrationen, der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, T- und B-Lymphozyten und Plasmazellen (PZ) in die Magenschleimhaut sowie der Induktion einer spezifischen

lokalen und systemischen Antikörperantwort (70-72). Die Immunantwort auf *H. pylori* ist in Abbildung 3-1 zusammengefasst. Die Reaktion des Immunsystems reicht in vielen Fällen nicht aus, um die Infektion zu beseitigen (70), was die hohen Durchseuchungsraten erklärt.

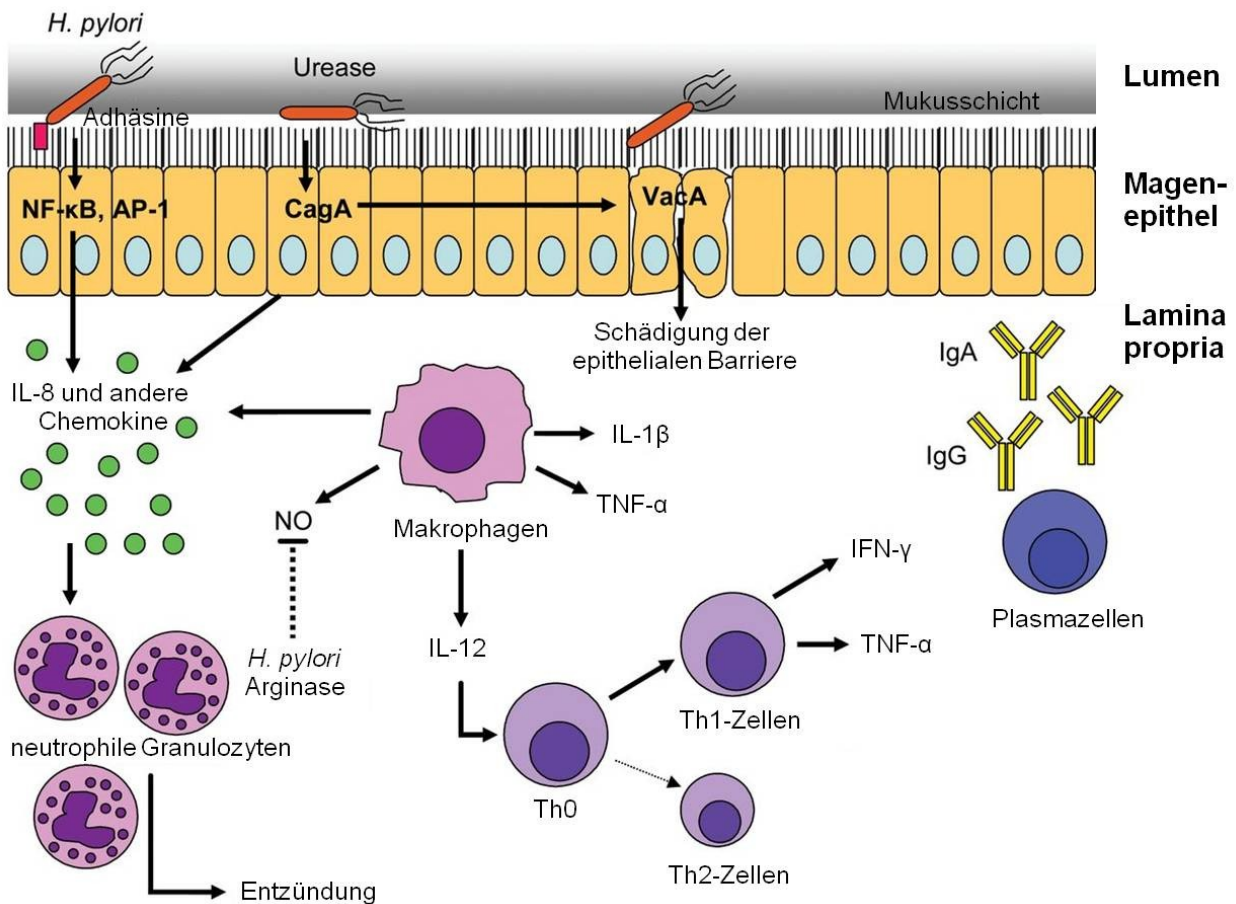


Abbildung 3-1 Schema der Immunantwort auf *H. pylori* und der Pathogenese der Infektionen

H. pylori verbleibt im Magenlumen und kolonisiert das Magenepithel mithilfe der Adhäsine und der Urease. Die Bindung von *H. pylori* an Epithelzellen und die Injektion von CagA induzieren eine Signaltransduktionskaskade, die in der Produktion von IL-8 und anderen Chemokinen resultiert. Die Sekretion von IL-8 wirkt chemotaktisch auf Zellen der angeborenen Immunantwort und führt zur Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Der Kontakt zum Epithel führt ebenfalls zur Freisetzung von *H. pylori*-Virulenzfaktoren, z.B. VacA, das für die Bildung großer Vakuolen in den Epithelzellen verantwortlich ist und somit die Apoptose und Schädigung der epithelialen Barriere auslöst. In Folge dessen können weitere *H. pylori*-Antigene die Epithelschicht passieren und Makrophagen aktivieren, die ihrerseits NO und proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 β , TNF- α und IL-12 freisetzen. Die IL-12-Sekretion führt zur Polarisierung der Th1 CD4⁺-Antwort und Th1-Zellen. Die Th1-Zellen sind in der Lage, proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α und IFN- γ freizusetzen, die eine Entzündung in der Lamina propria bewirken und zur Ausbildung einer Gastritis führen. Um der Immunantwort zu entgehen, hat *H. pylori* Mechanismen entwickelt, wie z.B. die Expression einer Arginase, welche die Produktion des radikalen Moleküls NO reduziert (gestrichelte Linie). (modifiziert nach Portal-Celhay and Perez-Perez (73))

3.1.4.1. Angeborene und erworbene Immunantwort

Die Reaktion des Immunsystems auf eine Infektion mit *H. pylori* kann in die angeborene und die erworbene Immunantwort unterteilt werden. Bei der angeborenen Antwort handelt es sich

um eine schnelle, unspezifische Reaktion auf charakteristische Strukturen des Bakteriums, sogenannte PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), die zur Auslösung von immunologischen Signalkaskaden und der Abtötung von Bakterien führen (74). Die Erkennung erfolgt dabei u.a. durch Toll-like-Rezeptoren (TLR), die von Antigen-präsentierenden Zellen (APZs) wie Makrophagen und dendritischen Zellen, aber auch von Magenepithelzellen exprimiert werden (75-77). Der Kontakt von bakteriellen Komponenten, wie LPS, Flagellin oder CpG-DNA, mit TLRs induziert die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8 und IL-12 (74, 76, 78-80). Diese führen zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, gefolgt von der Infiltration von B- und T-Lymphozyten ins entzündete mukosale Gewebe (Abb. 1-1) (81-85). Die neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sind in der Lage, *H. pylori* zu phagozytieren und anschließend zu lysieren (86).

Die adaptive Immunität umfasst vor allem B- und T-Lymphozyten mit ihren spezifischen Rezeptoren sowie die von PZ gebildeten Immunglobuline (Ig). In *H. pylori*-infizierten Patienten sammeln sich T- und B-Zellen oft in isolierten lymphatischen Follikeln mit Keimzentren an, was auf eine kontinuierliche Antigenpräsentation hinweist (23). Die im Laufe der Infektion von APZs phagozytierten Bakterien und bakteriellen Proteine werden auf MHCII-Molekülen präsentiert und führen so zur Aktivierung und Differenzierung antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen (87, 88). Allgemein können naive CD4⁺ T-Zellen (Th0) in T-Helfer1 (Th1), Th2 und Th17 Effektorzellen oder in regulatorische T-Zellen (Tregs) differenzieren, die sich in ihren sezernierten Zytokinen und somit in ihren Funktionen unterscheiden (89). Die mukosalen T-Zellen *H. pylori*-infizierter Patienten zeigen einen ausgeprägten Th1 Phänotyp, der sich durch die Sekretion von Interferon- γ (IFN- γ) und TNF- α auszeichnet (Abb. 1-1)(90, 91). Die lokale Th1-Prägung der T-Lymphozyten führt somit zu einer verstärkten Aktivierung von Makrophagen und Neutrophilen, die in der Lage sind, reaktive Sauerstoff- bzw. Stickstoffverbindungen zu bilden, jedoch keine effiziente Bekämpfung des Bakteriums erreichen, sondern sogar das Magenepithel schädigen können (70, 92).

Trotz der starken, von *H. pylori*-induzierten Stimulation sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems kommt es in den meisten Fällen ohne antibiotische Behandlung der Infektion nicht zu einer erfolgreichen Kontrolle (93). Verschiedene Immunevasionsstrategien, mit denen sich *H. pylori* der Wirts-Immunantwort entzieht, werden für die lebenslang persistierende Infektion und die damit einhergehende Entzündungsreaktion

verantwortlich gemacht. So führt beispielsweise das Zytotoxin VacA zu einer Inhibition der Antigenpräsentation und einer verminderten T-Zell Proliferation (52, 59).

3.1.4.2. Humorale Immunantwort auf eine *H. pylori*-Infektion

Die humorale Immunantwort fungiert als Schutzmechanismus der Extrazellularräume des menschlichen Organismus. Extrazelluläre Pathogene werden dabei mithilfe von Antikörpern, welche von PZ gebildet werden, zerstört und darüber hinaus die Ausbreitung intrazellulärer Infektionen verhindert.

Infolge einer *H. pylori*-Infektion kommt zu einer Einwanderung von mononukleären Zellen in die Magenschleimhaut. (70, 71). Insbesondere B-Zellen (BZ) und PZ, welche sehr selten oder nicht in normaler Magenschleimhaut zu finden sind, gelten als wichtige Indikatoren für eine chronische Entzündungsantwort (94). In Folge einer Antigenerkennung und vollständigen Aktivierung, entweder T-zellabhängig oder -unabhängig, differenzieren BZ entweder in *memory* BZ (mBZ) oder PZ (95). Letztere sezernieren Antikörper, welche an Pathogene binden und diese damit für den Abbau durch Makrophagen markieren oder das Komplementsystem aktivieren können (96). Die vorherrschende BZ-Antwort im mukosalen Gewebe bei einer *H. pylori*-Infektion ist die Produktion von sekretorischem IgA, welches ins Lumen transportiert werden kann und dort einen gewissen Schutz bietet, in dem es die mikrobielle Adhäsion verhindert oder Toxine neutralisiert (97). Im Verlauf der Infektion mit *H. pylori* kommt es zu einer deutlich ausgeprägten BZ-Antwort, und es werden spezifische Antikörper gegen verschiedene *H. pylori*-Antigene, wie z.B. Urease, Flagellin und VacA, im Serum und Magenlumen infizierter Patienten gefunden (98-100).

Trotz der starken humoralen Immunantwort werden die Erreger jedoch nicht eliminiert. Einige Studien deuten darauf hin, dass eher eine T-zellvermittelte Immunität als eine humorale Antwort für die Kontrolle einer *H. pylori*-Infektion verantwortlich sein könnten (101-103). Im Tiermodell zeigte sich zum Beispiel, dass sogar in Abwesenheit funktioneller Antikörper die Infektionsrate unverändert bleibt (103, 104). Darüber hinaus zeigten Studien an Mäusen, dass eine schützende Immunität gegenüber der Infektion mit *H. pylori* auch in Abwesenheit von Antikörpern erreicht werden kann (101).

Zusätzlich konnten autoreaktive Antikörper gegen die H^+/K^+ -ATPase von Belegzellen in der Magenschleimhaut nachgewiesen werden, welche sich möglicherweise durch molekulares Mimikry entwickeln konnten und eher zur weiteren Gewebeschädigung beitragen (105-107).

Trotz der sich aus der bisherigen Datenlage andeutenden Hypothese, dass BZ bei der Immunantwort gegenüber *H. pylori* eine eher untergeordnete Rolle spielen, spielt die Infektion mit diesem Pathogen eine klar erwiesene Rolle bei der Entwicklung des MALT-

Lymphoms im Magen (23, 25). Das MALT-Lymphom entsteht aus der unkontrollierten, polyklonalen Expansion einer Marginalzonen-BZ, welche zur Entwicklung eines monoklonalen Tumors führt. Allem Anschein nach sind die zytolytischen Mechanismen *H. pylori*-spezifischer T-Zellen aus MALT-Lymphom-Gewebe, durch die normalerweise aktivierte BZ entfernt werden, unzureichend (108). Dies führt dann zum unkontrollierten Wachstum der BZ im MALT-Lymphom.

3.1.5. Die Rolle von iNOS und Stickstoffmonoxid während einer *H. pylori*-Infektion

Eine Infektion mit *H. pylori* führt zur erhöhten Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS oder NOS2) in der Magenmukosa, nachgewiesen mittels Immunhistochemie und Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) (109, 110).

Das Enzym iNOS ist eines von drei NO-Synthasen (NOS) und katalysiert die Produktion von NO durch Oxidation der Aminosäure L-Arginin (111). NO ist ein kurzlebiges Radikal, das im Organismus relativ frei diffundiert und in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Während die endotheliale NOS (eNOS) und die neuronale NOS (nNOS) Calcium-abhängige NOS sind, die konstitutiv exprimiert werden, ist iNOS eine Calcium-unabhängige NOS, deren Expression reguliert wird (112). eNOS- oder nNOS-exprimierende Zellen generieren nur kleine Mengen NO, welches eine wichtige Rolle in Proteinregulationen bzw. Signalweiterleitungen in verschiedenen physiologischen Kontexten spielt (113, 114). iNOS hingegen produziert größere Mengen von NO, welches als unspezifisches, toxisches Abwehrmolekül und Regulator der angeborenen Immunantwort fungiert (115). Eine iNOS-Expression ist in ruhenden Zellen nicht nachzuweisen; die Induktion erfolgt durch bakterielles LPS oder proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ , TNF- α oder IL-1 β (116-119). Die Regulation der NO-Synthese durch iNOS findet hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene statt. Da iNOS in dimerer Form aktiv ist, macht die Dimerisierung einen der posttranslationalen Regulationsmechanismen aus (115, 120, 121). Die Präsenz von iNOS konnte bisher in verschiedenen Zelltypen gezeigt werden, vor allem in Makrophagen, aber auch in Monozyten (122), dendritischen Zellen (123, 124), neutrophilen Granulozyten (125), natürlichen Killerzellen (126) und Epithelzellen (127). Es wird angenommen, dass Makrophagen die Hauptproduzenten von iNOS in der Lamina propria von *H. pylori*-infizierten Patienten darstellen, aber die Verteilung der iNOS-Expression aller Lamina propria Leukozyten ist noch unbekannt. Es wurde gezeigt, dass *H. pylori* die Expression von iNOS sowohl im Magenepithel als auch in Makrophagen induziert, welche mit vermehrter Apoptose

und Schädigung von Epithelzellen in Zusammenhang steht (109, 128). NO ist jedoch auch ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort aufgrund der stark antimikrobiellen Wirkung (111). Durch die Produktion des Enzyms Arginase verhindert *H. pylori* die eigene Abtötung durch NO. Arginase wandelt L-Arginin in Harnstoff und Ornithin um. Da L-Arginin jedoch auch von der iNOS verwendet wird, um NO zu produzieren, kompetiert die bakterielle Arginase mit der iNOS um das L-Arginin, wodurch aktivierte Makrophagen in Anwesenheit von *H. pylori* weniger NO produzieren als in Abwesenheit des Keims (Abb. 3-1)(34, 129).

Eine chronische Entzündung, wie eine chronische *H. pylori*-induzierte Gastritis, führt zu einer kontinuierlichen Expression von iNOS (130). Eine anhaltend hohe Konzentration von NO in der Zelle wirkt mutagen, z.B. über die Bildung von Peroxynitrit, und erhöht die Wahrscheinlichkeit von Zellzyklusstörungen, Apoptose und DNA-Schäden (128, 131-133). Es kann zur DNA-Schädigung mittels Desaminierungen oder Nitrosylierungen sowie Transition oder Transversion von Nukleinsäurebasen kommen (30, 31). Indirekt kanzerogen wirkt NO über die Inaktivierung von DNA-Reparatur-Proteinen, z. B. der Alkyltransferase oder der DNA-Ligase, sowie über die Inaktivierung des Tumor-Suppressor-Proteins p53 (31, 134). Damit nimmt NO indirekt auch Einfluss auf die Zellzykluskontrolle und kann die Entstehung von Tumoren begünstigen (32). Interessanterweise wurde die Expression von iNOS sowohl in Magenkarzinomzellen als auch in MALT-Lymphomzellen nachgewiesen (135).

Zusammenfassend ist nicht klar, ob die Induktion von iNOS während einer Infektion mit *H. pylori* dem Schutz als antimikrobielle Barriere dient oder eher das Resultat einer *H. pylori*-assoziierten neoplastischen Veränderung ist.

3.2. B-Lymphozyten und die humorale Immunantwort

B-Lymphozyten sind Zellen, die einen spezialisierten B-Zellrezeptor (BZR) exprimieren, der es ihnen erlaubt, spezifische Antigene, d.h. unprozessierte extrazelluläre Epitope zu binden. In Folge einer Antigenerkennung und vollständigen Aktivierung, entweder T-zellabhängig oder -unabhängig, differenzieren BZ entweder in mBZ oder PZ (95). PZ sezernieren den BZR in seiner löslichen Form, den Antikörpern, welche vielseitige Funktionen haben.

3.2.1. Der B-Zellrezeptor

Jede BZ trägt einen einzigartigen membrangebundenen BZR, in seiner sezernierten Form Antikörper oder Ig. Dabei besitzen beide Formen dieselbe Grundstruktur (136). Jedes Ig

besteht aus vier Polypeptidketten, wobei aufgrund ihres Molekulargewichts jeweils zwei schwere (*heavy*) IgH-Ketten sowie zwei leichte (*light*) IgL-Ketten unterschieden werden. Die Aminosäuresequenzen beider IgH-Ketten bzw. IgL-Ketten eines Ig sind identisch, unterscheiden sich jedoch in der Sequenz von anderen Ig. Disulfidbrücken und nichtkovalente Wechselwirkungen verbinden die schweren IgH-Ketten miteinander und verknüpfen jeweils eine leichte mit einer schweren Kette (137). Dadurch ergibt sich eine dreidimensionale Y-förmige Struktur mit drei globulären Abschnitten, die durch eine bewegliche, bandförmige Gelenkregion variabler Länge miteinander verbunden sein können (Abb. 3-2). Jede Ig-Kette besteht aus mehreren Proteindomänen, welche etwa 110 Aminosäuren lang sind und ähnliche Aminosäuresequenzen aufweisen. Leichte Ketten setzen sich aus zwei dieser Ig-Domänen zusammen, schwere Ketten hingegen aus vier bzw. fünf (138). Die Aminosäuresequenzen der aminoterminal gelegenen Domänen weisen eine hohe Variabilität zwischen verschiedenen Ig auf, weshalb sie als V-Domänen bezeichnet werden.

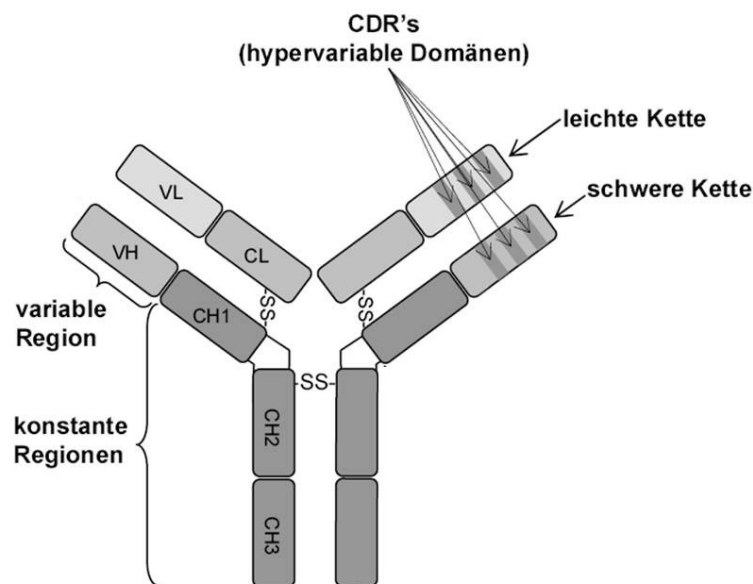


Abbildung 3-2 Schematische Struktur eines Immunglobulinmonomers

Immunglobuline setzen sich aus je zwei identischen leichten Ketten und schweren Ketten zusammen, die durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Dargestellt sind außerdem die variablen schweren (VH) und variablen leichten (VL) Regionen sowie die konstanten leichten (CL) und konstanten schweren (CH) Regionen, die sich in Domäne 1-3 unterteilt, wie es z.B. in einem IgG gefunden wird. Innerhalb der variablen Region sind auch die hypervariablen Domänen gezeigt. CDR - engl. *complementary determining region* (139 modifiziert)

Die V-Domänen der schweren Ketten (V_H) bilden zusammen mit den V-Domänen der leichten Ketten (V_L) die variable Region des Ig, welche die Antigenbindungsstelle bildet. Die variablen Regionen setzen sich aus hypervariablen Bereichen und Gerüstregionen (FWR, engl. *framework region*) zusammen. Die hypervariablen Bereiche bestimmen das Antigen, das

gebunden werden kann, und werden deshalb auch CDR (engl. *complementary determining region*) genannt (CDR 1-3)(Abb. 3-2). Die vier FWRs (FWR 1-4) dagegen werden durch konservierte Nukleinsäuresequenzen kodiert und legen die räumliche Struktur der Antigenbindungsstelle fest.

Da innerhalb der carboxyterminal gelegenen Domänen einer Variante kaum Unterschiede auftreten, werden diese Domänen als konstante (*constant*) C-Domänen der schweren (C_H1 , C_H2 , etc.) und leichten (C_L) Ketten bezeichnet. Sie bilden zusammen die konstante Region des Ig und bestimmen die funktionellen Mechanismen (140). Die C-Domänen der leichten Ketten können aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in die zwei Typen λ und κ unterteilt werden. Ein funktioneller Unterschied dieser beiden Typen ist derzeit nicht bekannt, sie treten jedoch je nach Spezies in einem bestimmten Verhältnis ($\kappa : \lambda$) auf. Beim Menschen beträgt dieser etwa 2:1 (139). Die schweren Ketten unterteilen sich in die fünf Varianten μ , δ , γ , α bzw ϵ , resultierend in IgM, IgD, IgG, IgA bzw. IgE Ig-Isotypen. Neben diesen Isotypen oder Ig-Klassen ist eine weitere Unterteilung in die Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 sowie IgA1 und IgA2 möglich (140). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Sequenzen zeigen die Isotypen Variationen ihrer Struktur wie Anzahl der C-Domänen, Länge der Gelenkregion, unterschiedliche Anzahlen an Disulfidbrücken sowie deren Lokalisation, angehängte Oligosaccharide und die Fähigkeit Polymere zu bilden. So liegen membrangebundene Ig sowie sezerniertes IgG, IgD und IgE immer als Monomere vor, sezerniertes IgA kann sowohl als Monomer als auch als Dimer vorliegen und sezerniertes IgM liegt meist als Pentamer vor. Die Polymerisierung wird dabei durch ein zusätzliches Glykoprotein, die sogenannte J-Kette, unterstützt. Des Weiteren unterscheiden sich sezernierte Isotypen in ihren Effektorfunktionen. Durch Bindungen der Fc-Fragmente an spezifische Rezeptoren ist sowohl ein Transport in bestimmte Kompartimente des Körpers wie Speichel, Tränen, Muttermilch und schleimige Sekrete möglich als auch die Aktivierung von Immuneffektorzellen wie Mastzellen, Makrophagen und Granulozyten. Diese führt abhängig von der Effektorzelle zu unterschiedlichen Reaktionen wie Phagozytose oder die Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Außerdem können die Fc-Bereiche von Ig, die in einem Antigen-Antikörper-Komplex vorliegen, die Komplementkaskade aktivieren. Membrangebundene Ig der BZ können mittels assoziierter Moleküle Signale ins Zellinnere weiterleiten und somit zur Änderung des Genexpressionsprofils führen (139).

3.2.2. Die Diversität des B-Zell-Repertoires

Diese Hypervariabilität eines BZR auf Proteinebene wird durch vier prinzipielle Prozesse auf molekulargenetischer Ebene generiert, die die Grundlage für die Diversität des humanen BZ-Repertoires darstellen: (I) verschiedene Ig-Gene, die in verschiedenen Gensegmenten angeordnet sind, mit (II) somatischer Rekombination der Ig-Gensegmente während der BZ-Reifung, (III) junktionale Diversifikation an der Schnittstelle der verschiedenen rekombinierten Ig-Gensegmente und (IV) somatische Hypermutationen in der ausgereiften BZ nach Antigen-Kontakt (141).

Die V-Regionen beider Ketten des BZR werden nicht durch ein einziges Gen kodiert, sondern durch verschiedene Gensegmente. Dies sind die V-Segmente und J-Segmente im Falle der leichten Ketten und zusätzlich zu diesen beiden die D-Segmente im Falle der schweren Ketten (142). Von jedem Segment gibt es im Genom mehrere Varianten, von denen jeweils eine im fertigen Gen wiederzufinden ist. Während der Entwicklung einer BZ im Knochenmark werden die Gene für die leichten und die schweren Ketten der Antikörper als zufällige Auswahlen von unterschiedlichen bereitstehenden DNA-Abschnitten zusammengefügt. Diese somatische Rekombination bezeichnet man auch als V(D)J-Rekombination (143). Es ist dem Zufall überlassen, welches Allel, d. h. welches Gen auf homologen Chromosomen, zuerst rekombiniert wird. Die Rekombination eines Allels inhibiert im Erfolgsfall die Bearbeitung des zweiten Allels (allele Exklusion)(144).

Der humane Locus für schwere Ketten befindet sich auf Chromosom 14 (14q32.33) und beinhaltet multigene Familien von V_H - (variable *heavy*), D- (*diversity*) und J_H - (*joining heavy*) Segmenten (145). Alle Gensegmente liegen in Clustern mehrerer sich voneinander unterscheidender Varianten vor, wobei sowohl funktionelle Gensegmente als auch Pseudogene vorkommen. Der V_H -Gencluster besteht aus 123 V_H -Segmenten von denen 44 als funktionell klassifiziert wurden, also theoretisch exprimiert werden können (146). Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten (mind. 80 % Übereinstimmung) können sieben V_H -Familien unterschieden werden. Die J_H -Gensegmentcluster bestehen aus sechs funktionellen J_H -Segmenten (147), und das D-Gensegmentcluster besteht aus 27 funktionellen Segmenten (148). Der IgH C_H -Locus beinhaltet 11 Gene, von denen zwei Pseudogene sind (146). Die humanen C_H -Gene für sekretorische Ig-Formen bestehen aus drei (γ und α) oder vier (μ und ϵ) Exons. Der V_H - und der C_H -Locus sind physikalisch auf einem Chromosom verbunden in der Reihenfolge von 5'- V_H -D- J_H - C_H -3'. Die humanen κ - und λ -Ketten Loci befinden sich auf Chromosom 2 (2p11.2) bzw. 22 (22q11.2) und bestehen aus 40 V_κ - und 30 V_λ -Segmenten sowie 5 J_κ - und 4 J_λ - und je einem C_L -Segment (149, 150).

Während der Entwicklung der B-Lymphozyten aus hämatopoetischen Stammzellen werden die Gensegmente in einer definierten Reihenfolge rekombiniert, was bestimmten Faktoren unterliegt (151-154). Die für die in mehreren Schritten ablaufende Rekombination erforderlichen Enzyme sind in einem Komplex organisiert, welcher als V(D)J-Rekombinase bezeichnet wird. Er setzt sich aus den RAG-Proteinen (Produkte rekombinationsaktivierender Gene) RAG-1 und RAG-2 sowie DNA-modifizierenden Enzymen (u.a. Ku, DNA-abhängige Proteinkinase, DNA-Ligase IV) zusammen (155). Eingeleitet wird die Rekombination durch Bindung der V(D)J-Rekombinase an Rekombinationssignalsequenzen (RSS), welche aus einem konservierten Heptamer (CACAGTG), einem variablen Spacer sowie einem Nonamer (ACAAAAACC) bestehen und die Gensegment-Sequenzen flankieren. Die Länge des Spacers ist ebenfalls konserviert und beträgt bei V_H - und J_H -Gensegmenten 23 Basenpaare, bei D-Gensegmenten hingegen 12 Basenpaare. Nach der 12/23-Regel werden nur Gensegmente miteinander verbunden, deren Spacer-Längen sich unterscheiden, um die biologische Produktivität sicherzustellen (156). Kurz zusammengefasst sind für die IgH und IgL-Ketten zusammen drei Haupt-Entwicklungsschritte definiert. In einem ersten Schritt werden in den lymphoiden Vorläuferzellen ein D an ein J_H -Segment rearrangiert, gefolgt von einer zweiten Genumlagerung, welches das stromaufwärts liegende V_H -Segment mit der D- J_H -Region verbindet. Das entstehende Exon kodiert die gesamte variable Domäne der schweren Kette des Ig (136). Die produktive V_HDJ_H -Region wird anschließend mit einer μ -Kette verbunden, und der BZ-Vorläufer exprimiert auf der Oberfläche einen prä-BZR. Abbildung 3-3 verdeutlicht schematisch die VDJ-Rekombination des Lokus für schwere Ig-Ketten. Wenn der prä-BZR funktionell ist, teilt sich in die Zelle in der nächsten Phase, im prä-BZ-Stadium, einige Male, verlässt den Zellzyklus und ordnet den IgL-Lokus um. Die IgL-Rekombination erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie für die IgH-Kette, jedoch mit dem Unterschied, dass kein D-Segment existiert. Meist werden im ersten Schritt die Gensegmente des κ -Lokus umgeordnet, wobei dies lediglich auf einem der beiden Chromosomen geschieht. Im Fall einer unproduktiven Genumordnung besteht die Möglichkeit, die ungenutzten distalen Gensegmente erneut zu rekombinieren (sog. *receptor-editing*). Ist auch diese Umordnung nicht produktiv, werden zuerst die Gensegmente des κ -Lokus des zweiten Chromosoms rekombiniert, anschließend gegebenenfalls die des λ -Lokus. Sobald eine der Rekombinationen zur Expression einer intakten leichten κ -Kette führt, wird zusammen mit den μ -Ketten ein vollständiger BZR des Isotyps IgM gebildet, andernfalls geht die BZ durch Apoptose zugrunde (144). Die BZ exprimiert nur einen Typ der IgL-Kette, was als Isotypausschluss bezeichnet wird.

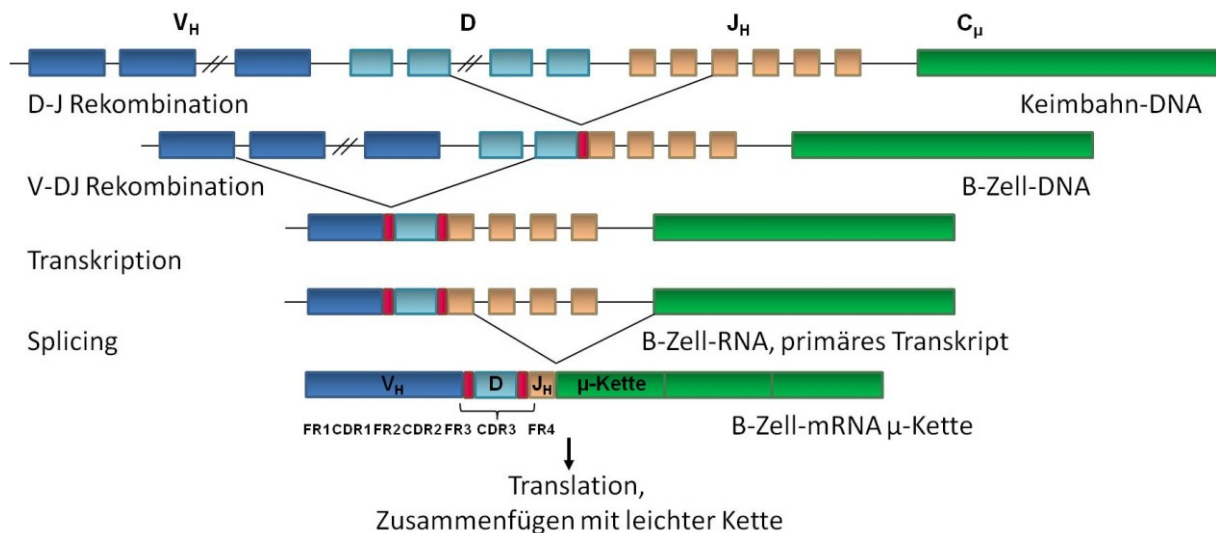


Abbildung 3-3 Schematische Darstellung der Prozesse der VDJ-Rekombination des Lokus für schwere Immunglobulinketten

Die V-Region der schweren Kette setzt sich durch drei Gensegmente zusammen. Zunächst lagern sich D- und J_H -Gene aneinander, dann wird das Exon durch das V_H -Gen durch eine zweite somatische Rekombination komplettiert.

Die reine kombinatorische Diversität ausgehend von diesem Prozess führt theoretisch zu $2,3 \times 10^6$ BZR. Jedoch kommt es im Rahmen der beschriebenen V(D)J-Rekombination durch eine unpräzise Verknüpfung der Gensegmente zu einer zufälligen Addition oder Deletion von Nukleotiden, d.h. zu einer so genannten junktionalen Diversifikation (155, 157). Die Anzahl der Nukleotide ist dabei zufällig und führt nicht selten über eine Verschiebung des Leserahmens zu einem Ausschluss unfunktioneller Antikörper, bei einer sinnvollen Gensequenz werden aber durch die junktionale Diversifikation weitere Antikörperspezifitäten möglich (158). Die CDR3-Region wird auf molekulargenetischer Ebene durch die Schnittstelle aus V- und J- Gensegment gebildet und stellt dadurch die variabelste aller CDR-Regionen dar; sie wird als ausschlaggebend für die spezifische Interaktion zwischen BZR und Antigen angesehen. Zusätzlich kann jeder einzelne BZR oder Antikörper nur mithilfe der CDR3-Sequenz identifiziert werden und größtenteils einen BZ-Klon definieren.

Am Ende des Entwicklungsprozesses steht eine unreife BZ (136). An diesem Punkt werden nun mittels negativer Selektion die meisten autoreaktiven BZ eliminiert, wobei verschiedene Mechanismen unterschieden werden können, z.B. Auslösen von Apoptose (klonale Deletion) (159), Inaktivierung (anerge Zellen) (160, 161) oder Einleitung weiterer Rekombinationen (*receptor-editing*) (162). Nicht-selektionierte unreife BZ verlassen das Knochenmark und wandern in die peripheren lymphatischen Organe aus (163). Dort differenzieren sie zu reifen, naiven B-Lymphozyten, die rezirkulieren und die Peripherie nach Pathogenen/Antigenen absuchen.

Während die bisher beschriebenen Diversifizierungs-Vorgänge im Rahmen der BZ-Reifung im Knochenmark stattfinden, wird durch eine somatische Hypermutation eine Diversifizierung der Ig-Gene in sekundären Lymphorganen auch nach erfolgtem Gen-Rearrangement möglich. Dabei kommt es nach Aktivierung der BZ durch Antigen-Kontakt (thymusabhängige Antigene) zu einer hohen Rate von somatischen Punktmutationen in den variablen Regionen von schwerer und leichter Kette. In der Folge werden mutierte Ig-Moleküle exprimiert, die unter Umständen sogar eine bessere Antigen-Bindung aufweisen als das Primärmolekül, was als Affinitätsreifung bezeichnet wird. Besonders zahlreiche Punktmutationen finden sich im Bereich der V-Abschnitte, die u.a. die CDR-Regionen kodieren (164).

Die Affinitätsreifung erfolgt innerhalb eines Keimzentrums, in dem die V-Domänen der Ig-Gene der proliferierenden BZ durch die somatische Hypermutation modifiziert werden. Dabei werden unter Einfluss des Enzyms aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (AID) neben kleinen Deletionen und Duplikationen hauptsächlich Punkt-mutationen induziert (je Zellteilung eine Mutation pro 10^3 Basenpaare) (165). Daraus resultierende Aminosäureaustausche können zu Änderungen der Spezifität und Affinität der Antigenbindungsstelle sowie der Stabilität des Gerüsts des Ig führen. Dadurch können sowohl nicht- oder höheraffine als auch autoreaktive Ig entstehen. Während der Affinitätsreifung werden in mehreren Schritten die Zellen positiv selektioniert, welche hoch-affine Ig exprimieren, sowie nichtbindende oder autoreaktive Zellen negativ selektioniert (166). Die stringente Selektion erfolgt im Keimzentrum durch Wechselwirkung der BZ mit follikulären Dendritischen Zellen, Makrophagen und einigen follikulären T-Helferzellen, welche das Antigen in Form von Immunkomplexen auf ihrer Oberfläche tragen (166, 167).

Eine weitere Modifikation der Ig-Gene, die im Keimzentrum stattfindet, ist der sogenannte Isotypwechsel, der vor allem nach T-Zellstimulation über CD40/CD40L-Interaktionen und durch den Einfluss verschiedener Zytokine induziert wird (168). Da immer das C-Gensegment exprimiert wird, welches dem rekombinierten VDJ-Segment am nächsten liegt (mit Ausnahme der gleichzeitigen IgM- und IgD-Expression), muss dieses für einen Wechsel des exprimierten Isotyps irreversibel ausgetauscht werden. Dies geschieht mittels nicht-homologer Rekombination zwischen sogenannten Schalterregionen (*switch*-Regionen), kurzen repetitiven DNA-Sequenzen, die vor jedem C-Gensegment lokalisiert sind (Ausnahme: C δ).

Dabei werden durch Loopbildung die zu rekombinierenden Schalterregionen in räumliche Nähe gebracht, die DNA anschließend enzymatisch durch die AID und die Uracil-N-

Glykosylase (UNG) in mehreren Schritten geschnitten und über Reparaturmechanismen wieder verknüpft. Diese Rekombination ist immer produktiv und führt je nach Zytokin-Einfluss zur Expression von Ig des Isotyps IgA, IgG oder IgE (168). Abbildung 3-4 stellt den Mechanismus des Isotypwechsels exemplarisch für einen Wechsel zu IgA1 dar.

BZ, die die Selektionsprozesse im Keimzentrum überlebt haben, durchlaufen entweder erneut eine Affinitätsreifung im Keimzentrum (26) oder sie verlassen das Keimzentrum, wo sie sich entweder zu mBZ oder zu PZ differenzieren können.

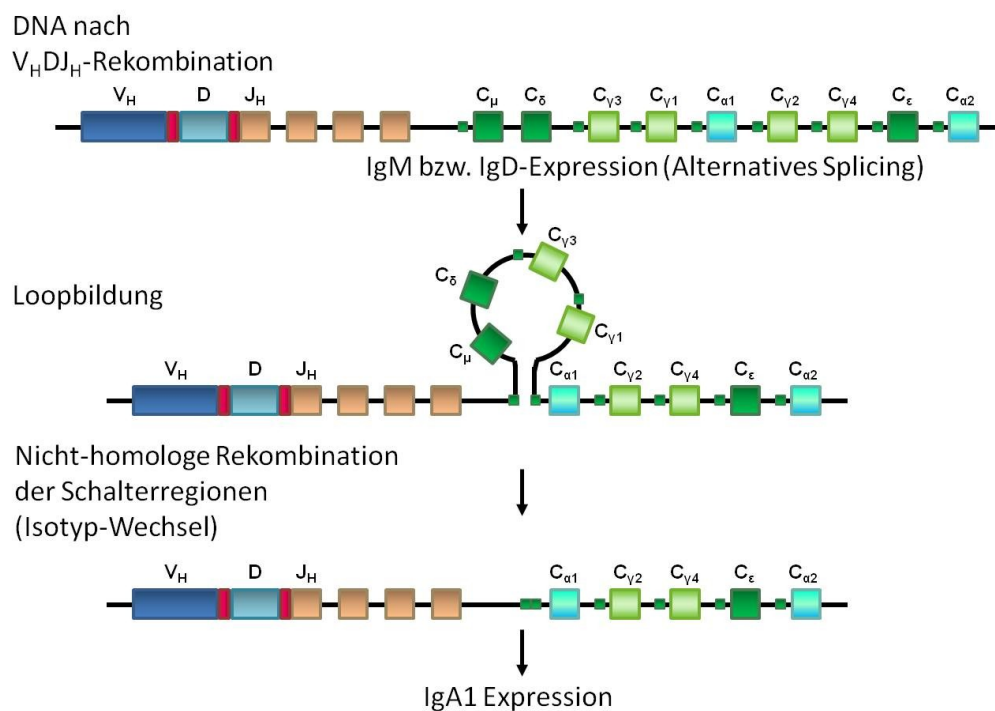


Abbildung 3-4 Mechanismus des Isotyp-Wechsels am Beispiel IgA1

Am Genlokus für die schwere Kette der Immunglobuline befinden sich konstante Abschnitte für IgM (C_μ), IgD (C_δ), IgG 1-4 ($C_{\gamma 1-4}$), IgE (C_ϵ) und IgA1 und 2 ($C_{\alpha 1/2}$). 5' dieser Gene befindet sich ein Intron, die sogenannte Schalterregion, die an der nicht-homologen Rekombination beteiligt ist. Eine Ausnahme stellt hierbei IgD dar, welches keine Schalterregion besitzt. Die Transkription des Keimbahntranskripts, IgM bzw. IgD, macht die DNA für die Enzyme der Rekombination zugänglich. Die Schalterregion des bisher verwendeten Isotyps und des zu bildenden Isotyps werden in die Nähe gebracht und bilden dadurch einen Loop. Das Enzym AID (aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase) und die Uracil-N-Glykosylase (UNG) führen in mehreren Schritten zu einem Doppelstrangbruch. Der Teil des Keimbahntranskripts, der zwischen der Schalterregion des bisher verwendeten Isotyps und der Schalterregion des zu bildenden Isotyps (hier IgA1) liegt, wird deletiert und die zwei Strangenden werden durch nicht-homologe Rekombination miteinander verbunden.

3.3. Vorarbeiten zu dieser Arbeit

Das SFB-Projekt, aus dem die vorliegende Arbeit entstammt, gründete ursprünglich auf dem Ziel, einen wirksamen Impfstoff gegen *H. pylori* zu entwickeln. Da die Effizienz eines Impfstoffes im Rahmen von Phase II Studien im Menschen im Gegensatz zum Tiermodell nicht zu belegen war (10), wurden im Folgenden innerhalb dieses Projektes mögliche Gründe für den mangelnden Impfschutz untersucht.

In diesem Projekt sollten insbesondere die Rolle von iNOS bzw. iNOS-exprimierender Zellen in der Magenmukosa von *H. pylori*-Patienten untersucht werden. Daher wurden zunächst immunhistochemisch CD68⁺ Makrophagen analysiert, da diese als wesentliche Produzenten von iNOS beschrieben sind (109). Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an CD86⁺ Makrophagen nicht mit der Zahl iNOS⁺ Zellen der Magenmukosa übereinstimmt sondern nur etwa ein Drittel von ihnen ausmacht (169, 170). Interessanterweise konnten in vorherigen Experimenten aus unserer Arbeitsgruppe immunhistochemisch gezeigt werden, dass in der Magenmukosa von *H. pylori*-infizierten Patienten MUM1⁺ PZ einen bedeutenden iNOS-exprimierenden Zelltypen ausmachen (169, 170). Etwa ein Drittel der iNOS⁺ Zellen sind demnach MUM1⁺ PZ, während dieser Zelltyp nicht in der Magenschleimhaut von gesunden Kontrollen zu finden war. Dieser Zelltyp wurde in dieser Form im Menschen noch nicht gezeigt und diesem Befund mag eine besondere Bedeutung zukommen, da iNOS-Expression in maligne entarteten humanen BZ mit Apoptoseresistenz in Verbindung gebracht wird (171) und iNOS-Expression zwar in MALT-Lymphomgewebe (ohne dass die zelluläre Quelle identifiziert worden wäre) aber nicht in der umgebenden, nicht entarteten Magenmukosa gefunden wurde (135, 172). Im Zuge von Vorarbeiten wurden iNOS⁺ PZ ebenfalls bei Patienten mit MALT-Lymphomen nachgewiesen, die in Folge einer chronischen Infektion mit *H. pylori* entstehen können. In MALT-Lymphom-Patienten, jedoch nicht in *H. pylori*-infizierten Patienten, wurde eine mukosale Expression des Tumorsuppressorprotein p53 nachgewiesen (170).

Besonders interessant ist, dass eine erhöhte Anzahl iNOS-positiver PZ von Probanden dieser vorangegangenen Impfstudie (10) mit der Fähigkeit korreliert, die experimentelle *H. pylori*-Infektion zu bekämpfen (Abb. 3-5)(169, 170). Während die Anzahl an iNOS⁺ MUM⁺ Zellen sechs Wochen nach der Infektion mit *H. pylori* noch vergleichbar in beiden Gruppen war, war die Anzahl nach zehn Wochen signifikant erhöht in den Individuen, die *H. pylori* selbstständig eradizieren konnten (Abb. 3-5). In dieser Impfstudie wurde nachgewiesen, dass die Freiwilligen, die die Infektion bekämpfen konnten, eine erhöhte Anzahl Impfstoff-Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen des Th1-Typs im peripheren Blut zeigten (10).

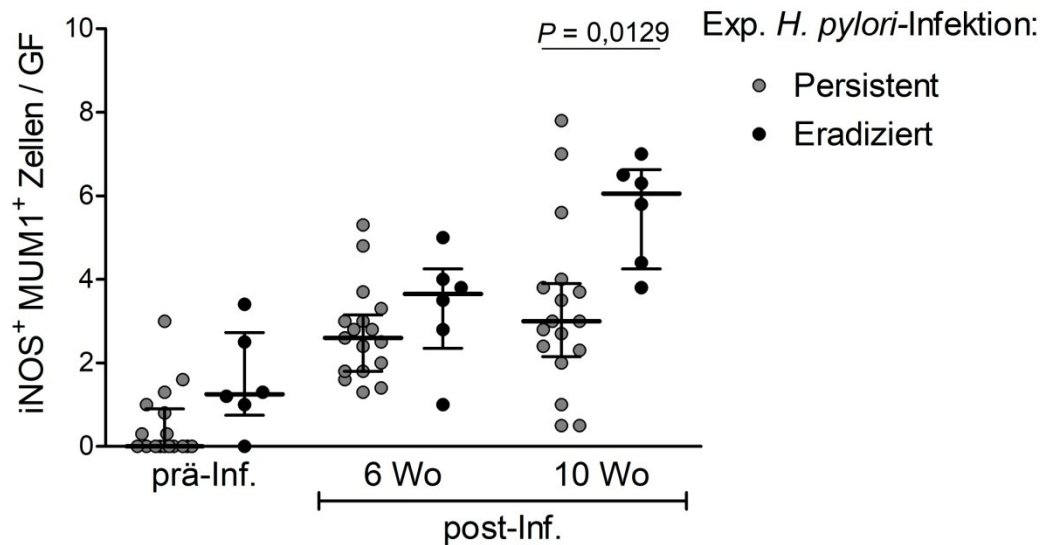


Abbildung 3-5 Erhöhte Anzahl von iNOS⁺ Plasmazellen in der Magenmukosa von Individuen, die eine experimentelle *H. pylori*-Infektion eradizieren konnten

Quantitative Analyse von iNOS⁺MUM1⁺ Zellen in der Magenmukosa von Individuen prä-Infektion (prä-Inf.) sowie 6 bzw. 10 Wochen (Wo) nach der experimentellen Infektion (post-Inf.) mit *H. pylori*. Biopsate wurden von Sudienteilnehmern erhalten, welche eine persistente *H. pylori*-Infektion hatten (Persistent, n = 17, grau) und Teilnehmern, welche *H. pylori* selbstständig eradizieren konnten (Eradiziert, n = 6, schwarz). Positive Zellen wurden pro 10 Gesichtsfelder (GF) gezählt, und die Werte als Mittel aller Zellen/GF berechnet. Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt (Mann-Whitney Test gefolgt von einer Bonferroni Korrektur). *P* Werte < 0.017 sind signifikant. (169)

3.4. Zielsetzung

Die Generierung von NO durch iNOS repräsentiert einen entscheidenden antimikrobiellen Effektormechanismus (111), ist ein relevantes Signalmolekül (173, 174) und wird mit pathologischen Folgen in Verbindung gebracht (128). Obwohl bereits iNOS mRNA bzw. Protein in der Magenmukosa *H. pylori*-infizierter Patienten detektiert werden konnte (109, 110), blieb die zelluläre Quelle von iNOS und ob sie funktionell ist und NO produziert unklar. Dies liegt hauptsächlich an den signifikanten Unterschieden der Regulationmechanismen der Genexpression und Enzymaktivität von iNOS zwischen verschiedenen Zelltypen und insbesondere zwischen Spezies (175). Daher ist es schwierig, die Erkenntnisse, die in Mausmodellen erzielt wurden (176, 177), auf die Situation in Patienten zu übertragen. Bisher war die iNOS-Expression in der Magenmukosa von *H. pylori*-infizierten Patienten nur polymorphkernigen Neutrophilen und Makrophagen zugeschrieben (109). Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die immunhistochemisch identifizierten iNOS-produzierenden PZ in *H. pylori*-infizierten Individuen (170) weiter zu charakterisieren, um eine Einordnung des erstmals beschriebenen Subtyps von PZ in die komplexen Zusammenhänge im mukosalen Gewebe zu ermöglichen und möglicherweise die auslösenden Faktoren der iNOS-Expression aufzuklären. Die Charakterisierung der BZ-Populationen erfolgte hierbei in drei Teilschritten. Der erste Teil beinhaltete eine phänotypische Charakterisierung der BZ-Populationen in *H. pylori*-infizierten Patienten und Kontrollen mithilfe von verschiedenen zellspezifischen Markern und unter Verwendung von Durchflusszytometrie und Immunhistochemie. Da die Präsenz von iNOS-Proteinen nicht notwendigerweise schlussfolgern lässt, dass diese Proteine auch enzymatisch-aktiv sind (175), wurde die Funktionalität der iNOS-Enzyme in iNOS⁺ PZ untersucht. Außerdem wurden Biopsieüberstände und Serumproben mittels immunologischer Methoden (ELISA und Bead-basierte Immunoassays) auf *H. pylori*-spezifische Antikörper, auf die Verteilung der verschiedenen Ig-Isotypen und auf entzündliche Zytokine (wie z.B. IFN- γ und TNF- α) untersucht. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob die Expression von iNOS eine generelle Eigenschaft von humanen PZ in mukosalem Gewebe gastrointestinaler Infektionen ist. Zu diesem Zweck wurden immunhistochemisch iNOS⁺ MUM1⁺ Zellen in duodenalen Gewebebiopsaten von mit *Tropheryma whipplei*, HIV oder *Giardia duodenalis* infizierten Patienten untersucht.

Die iNOS-Expression in mukosalen PZ während einer *H. pylori*-Infektion könnte das Resultat von Signalen an PZ oder den Vorläuferzellen im spezifischen Verlauf dieser Infektion sein. Die Identifizierung dieser Signale könnte zum besseren Verständnis der Abwehr von *H. pylori* beitragen. Da die iNOS-Expression u.a. durch IFN- γ induziert werden kann, wurde mittels

Durchflusszytometrie und quantitative real-time PCR untersucht, ob die iNOS-Expression mit BZ-Effektorfunktionen, wie der Zytokin-Produktion, assoziiert ist.

Der zweite und dritte Teil dieser Arbeit beinhalten die Analyse des Ig-Repertoires, das von iNOS⁺ bzw. iNOS⁻ PZ sezerniert wird, um den Einfluss der PZ bei der Eradizierung von *H. pylori* aus einem neuen Blickwinkel zu untersuchen. Die beiden Teile bauen aufeinander auf.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das Ig-Repertoire von iNOS⁺ und iNOS⁻ mukosalen PZ aus *H. pylori*-infizierten Patienten mittels Einzelzell-RT-PCR und anschließender Sequenzierung der V_HDJ_H-Regionen molekularbiologisch charakterisiert und die beiden Ig-Repertoires verglichen. Dabei wurden die Isotyp-Verteilungen, die Nutzung der V_H- und J_H-Elemente, CDRH3-Längen sowie somatische Mutationen innerhalb der variablen Antikörperregion untersucht, um so indirekt Hinweise auf die Klonalität bzw. auf die Affinitätsreifung zu erhalten.

Um zu verstehen, welche Rolle den iNOS⁺ PZ und den von ihnen sezernierten Ig bei der *H. pylori*-Infektion zukommt, wurden im dritten Teil die Antikörper rekombinant hergestellt, um die Spezifität gegen *H. pylori*-Antigene und weitere Antigene mittels ELISA und Western-Blot zu untersuchen. Die Herstellung der Antikörper erfolgte mittels Klonierung der variablen Bereiche der schweren und korrespondierenden leichten Ig-Ketten aus einzelnen PZ in spezielle Expressionsvektoren und anschließender Transformation einer humanen Zelllinie (HEK 293T) (178). Somit ermöglichte die Methode eine direkte Bestimmung der Häufigkeit von erregerspezifischen humanen PZ bzw. autoreaktiven PZ innerhalb der iNOS⁺ und iNOS⁻ PZ der Magenschleimhaut und erlaubte dadurch Rückschlüsse über die Effizienz der jeweiligen humoralen Immunantwort. Das Reaktivitätsprofil der rekombinanten Antikörper konnte dann mit der Sequenzinformation verknüpft werden, die im Rahmen der molekularen Charakterisierung im zweiten Teil bestimmt worden war.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Material

4.1.1. Technische Geräte

Tabelle 4-1 Technische Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Bakterienbrutschrank	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, DE
Bakterienbrutschrank mit Schüttler	TH 15, Edmund Bühler, Hechingen, DE
Brutschrank, 5 % CO ₂	BB15 function line, Heraeus, Hanau, DE
Brutschrank, 80 % O ₂	BBD 6220, Heraeus, Hanau, DE
Biometra Thermocycler T3000	Labrepco, Horsham, PA, USA
Dampfdruckkochtopf	WMF Easy Transtherm, DE
DS34 Direct Screen Instant Camera	Polaroid, Dreieich-Sprendlingen, DE
Elektrophorese-Kammer	C.B.S. Scientific Co, Del Mar, CA, USA; Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE
ELISA-Reader	VersaMax microplate reader, Molecular Devices, Chicago, US
FACS Aria II cell sorter	Becton Dickinson (BD), Heidelberg, DE
FACS Calibur	BD, Heidelberg, DE
FACS Canto II	BD, Heidelberg, DE
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Carl Zeiss, DE
Microprocessor pH-Meter	pH21, Hanna instruments, DE
Mikrotom RM2125 RT	Leica Biosystems, Nussloch, DE
Mikrowelle Privileg 8523G	Otto GmbH, Hamburg, DE
MultiCycler PTC-200	Biozym Scientific, Oldendorf, DE
NanoDrop®	Modell ND-1000, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE
Schüttler	KM-2 AKKU, Edmund Bühler, Hechingen, DE
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Sterilbank	HeraSafe, Heraeus, Hanau, DE
Transilluminator 312nm	Herolab GmbH, Wiesloch, DE
Wasserbad (Histologie) WB 693	Vogel Medizintechnik, Fernwald, DE
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R, Megafuge 1.0, Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, DE

4.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4-2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Abgene®PCR Plates Thermo-Fast®96, Low Profile	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Adhäsive PCR-Verschlussfolie	VWR International, Dresden, DE
Chromatographie-Zentrifugationssäulen	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Combitips (1,0 ml und 1,25 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Deckgläschen (21x26 mm und 24x50 mm)	Roth, Karlsruhe, DE
Domed Cap Strips	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Einfrierröhrchen (1 ml)	NUNC von Sigma-Aldrich, München, DE
Einwegpipettenspitzen(1 ml, 200 µl, 10 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
ELISA-Platten	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
ep.T.I.P.S. Reloads (2-200 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Erlenmeyerkolben (100 ml)	Schott, Mainz, DE

Bezeichnung	Hersteller
FACS-Gefäße (5 ml)	Polystyren Rundbodengefäße, BD, Heidelberg, DE
Fettstift	Linaris, Wertheim, DE
konische Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD, Heidelberg, DE
Leucosep-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Kanüle (Blunt Fill18Gx1 ½)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
MicroAmp® Fast Optical 96-well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystem by Life Technologies, Ober-Olm, DE
Multi-Kanal-Pipette (100 µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg, DE
PCR tubes	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Reaktionsgefäße (1500 µl, 500 µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Rundbodenröhrchen	BD, Heidelberg, DE
SafeSeal-Tips premium (100 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific, Oldendorf, DE
SafeSeal-Tips professional (10µl)	Biozym Scientific, Oldendorf, DE
Serologische Einwegpipetten (5, 10 und 25 ml)	BD, Heidelberg, DE
Skalpell	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Spritze (Omnifix Luer Lock Solo) 10ml	B.Braun, Melsungen, DE
SuperFrost® Plus Objektträger	R.Langenbrinck Labor & Medizintechnik, Emmendingen, DE
Vacutainerröhrchen (heparinbeschichtet, 10 ml)	BD, Heidelberg, DE
X-Tracta	Biozym Scientific, Oldendorf, DE
Zählkammer	HYCOR Biomedical, Kassel, DE
Zellkulturflaschen	250 ml, BD, Heidelberg, DE T75, Sarstedt, Nümbrecht, DE T25, Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 48- und 96-Well-Platten)	NUNC von Sigma-Aldrich, München, DE
Zellkulturschalen (5 cm und 8,5 cm)	BD, Heidelberg, DE

4.1.3. Chemikalien

Tabelle 4-3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München, DE
Amphotericin B	PAA, Cölbe, DE
Antikörperverdünnungspuffer	DakoCytomation, Hamburg, DE
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Beriglobin	Sigma-Aldrich, München, DE
β-Mercaptoethanol	Invitrogen von Life Technologies, Ober-Olm, DE
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf, DE
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, München, DE
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, DE
BSA	Sigma-Aldrich, München, DE
Coomassie Blue R250	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Cyclosporin A	Sigma-Aldrich, München, DE
DAF-FM Diacetat	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
DAPI	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Deoxynucleotide (dNTP) Mix (je 10mM)	Sigma-Aldrich, München, DE

Bezeichnung	Hersteller
destilliertes Wasser	Ampuwa, Fresenius, DE
DNAse I	Roche, Berlin, DE
DMSO	Sigma-Aldrich, München, DE
EDTA	Sigma-Aldrich, München, DE
Essigsäure	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol	Baker, NJ, USA
Ethidiumbromidlösung 1 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco by Life Technologies, Ober-Olm, DE
FCS Ultra-low IgG	Gibco by Life Technologies, Ober-Olm, DE
Ficoll-Hypaque (Natriumdiatrizoat)	GE Healthcare, Freiburg, DE
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Inc., Hayward, CA, USA
GeneAmp® 10x PCR Buffer II 100mM Tris-HCl, pH8,3 (bei 25°C) 500mM KCl	Applied Biosystem by Life Technologies, Ober-Olm, DE
GeneAmp® MgCl ₂ -Solution (25mM)	Applied Biosystem by Life Technologies, Ober-Olm, DE
Glycin-HCL (0,1 M, pH 3)	Sigma-Aldrich, München, DE
GlycoBlue™	Ambion, Austin, TX, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, München, DE
Hämatoxin	Dako, Hamburg, DE
Isopropanol	Merck, Darmstadt, DE
Ionomycin	Biotrend Chemikalien, Köln, DE
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt, DE
Kollagenase Typ II-S (Clostridiopeptidase A von <i>Clostridium histolyticum</i>)	Sigma-Aldrich, München, DE
L-Glutamin	Gibco by Life Technologies, Ober-Olm, DE
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, München, DE
LB-Agar und -Medium	Gibco by Life Technologies, Ober-Olm, DE
mi-100bp+ DNA Marker (0.1 µg/µL)	Metabion, Martinsried, DE
Natriumazid	Merck, Darmstadt, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, München, DE
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin, DE
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
PBS	PAA, Pasching, AT
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Biochrom, Berlin, DE
Percoll	GE Healthcare, Uppsala, SWE
peqGOLD RNAPure™	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE
4 % Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, München, DE
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Sigma-Aldrich, München, DE
PMA	Biotrend Chemikalien, Köln, DE
Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare, Freiburg, DE
Primer p(dT) ₁₅ (800 ng/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Restriktionsendonukleasen: AgeI-HF (20 U/µl) BsiWI (10 U/µl) SalI-HF (20 U/µl) XhoI (20 U/µl) Cutsmart Puffer 10x NEB 3.1. Puffer 10x	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE
RNAlater®	Ambion, Austin, TX, USA

Bezeichnung	Hersteller
RNasin Plus Rnase Inhibitor® (40 U/μL)	Promega, Madison, WI, USA
RPMI 1640 Medium	Gibco by Life Technologies, Ober-Olm, DE
Salmon Sperm DNA Solution	Invitrogen von Life Technologies, Ober-Olm, DE
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Saponin	Sigma-Aldrich, München, DE
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich, München, DE
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Spermidin (50 nM)	Sarka Ruzickova, Prag, CZE
SuperFect Transfection Reagent®	Qiagen, Hilden, DE
T4-DNA-Ligase (400 U/μl) und 10x Reaktionspuffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE
TaqMan® Genexpressionsassay Hu GAPDH VIC/MGB hu IL-6 FAM-MGB (Hs00985639_m1) hu IL-10 FAM-MGB (Hs00961622_m1) hu TNF FAM-MGB (Hs99999043_m1) hu IFN-γ FAM-MGB (Hs00989291_m1)	Applied Biosystem by Life Technologies, Ober-Olm, DE
TaqMan® PreAmp Master Mix	Applied Biosystem by Life Technologies, Ober-Olm, DE
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystem by Life Technologies, Ober-Olm, DE
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, DE
TMB Substrat Set	Biolegend, Fell, DE
Tris-borate-EDTA (TBE) 10x	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris-HCl (1 M, pH 8,5)	Sigma-Aldrich, München, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, DE
tRoti®-Load-DNA short-run (supplementiert mit 1 mL Glycerol, 8 mL ddH ₂ O und 1:5000 GelRed™)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, München, DE
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München, DE
Trypsin Inhibitor (<i>Glycine max</i>)	Sigma-Aldrich, München, DE
Tween20	Dako, Hamburg, DE
Xylol (Isomere)	Carl Roth, Karlsruhe, DE

4.1.4. Puffer und Medien

Tabelle 4-4 Zusammensetzung von Puffern und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
B-Medium	RPMI 1640; 25 mM Hepes; 1 mM Natriumpyruvat and 4 mM L-Glutamin; 10 % (v/v) FCS,
BÜ-Medium	RPMI 1640; 4 mM L-Glutamin; 1 % (v/v) Pen/Strep; 250 µg/ml Amphotericin B
Einfriermedium	PBMC und LPL: FCS, 10 % DMSO B-LZL: B-Medium, 40 % FCS, 10 % DMSO HEK-293T: HEK-Medium (10 % FCS); 10 % DMSO
Erylysepuffer	20 mM KHCO ₃ ; 310 mM NH ₄ Cl; 1 mM EDTA; destilliertes Wasser
HEK-Medium	DMEM, 4,5 g/l Glukose; 25 mM Hepes; 2 mM L-Glutamin; 1 mM Natriumpyruvat; 10 % (v/v) FCS

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	Selektives LB-Medium 20 g/l: 75 µg/ml Ampicillin Selektive LB-Platten 35 g/l: 100 µg/ml Ampicillin
LPL-Medium	RPMI 1640; 4 mM L-Glutamin; 1 % (v/v) Pen/Strep; 250 µg/ml Amphotericin B; 7,5 % (v/v) FCS
PBMC-Medium	RPMI 1640; 4 mM L-Glutamin; 1 % (v/v) Pen/Strep; 250 µg/ml Amphotericin B; 10 % (v/v) FCS
PBA (PBS + BSA + Natriumazid)	90 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O; 140 mM NaCl; 27 mM KCl; 15 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,5 % (w/v) BSA; 0,02 % (v/v) NaN ₃
PBS, pH 7,6	90 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O; 140 mM NaCl; 27 mM KCl; 15 mM KH ₂ PO ₄
PBS/ BSA	90 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O; 140 mM NaCl; 27 mM KCl; 15 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,5 % (w/v) BSA
Proteinladepuffer (6x)	60 % (v/v) Glycerol; 30 % (v/v) β-MeEtOH; 14 % (w/v) SDS; 400 mM Tris-HCl (pH 6,8); 0,5 % (w/v) Bromphenolblau
Sammelgel (5 %)	5 % (v/v) Acrylamid; 130 mM Tris-HCl (pH 6,8); 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,1 % (v/v) TEMED
SDS-Laufpuffer (1x)	192 mM Glycin; 25 mM Tris-Base; 0,1 % (w/v) SDS
SOC-Medium	LB-Medium; 20mM MgCl ₂ ; 20 mM Glukose
TBS, pH 7,5	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl
TBS/Tween	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 0,05 % Tween20
Trenngel (12 %)	12 % (v/v) Acrylamid; 375 mM Tris-HCl (pH 8,8); 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,05 % (v/v) TEMED
Zellkulturmedium PBMC	RPMI 1640; 25 mM Hepes; 4 mM L-Glutamin; 10 % (v/v) FCS; 1 % (v/v) Pen/Strep
Zitratpuffer, pH 6	10 mM Zitronensäure; 10 mM NaOH; destilliertes Wasser

Das FCS wurde immer bei 56°C im Wasserbad für eine Stunde hitzeinaktiviert.

4.1.5. Kommerzielle Komplettsysteme

Tabelle 4-5 Kommerzielle Komplettsysteme

Bezeichnung	Hersteller
AmpliTaQ® DNA Polymerase kit - AmpliTaQ® DNA Polymerase - GeneAmp® 10x PCR Buffer II - GeneAmp® MgCl ₂ -Solution (25 mM)	Applied Biosystems by Life Technologies, Ober-Olm, DE
CBA flex set human IgA, IgM, total IgG	BD, Heidelberg, DE
Dako REAL™ Detektionssystem Alkaline Phosphatase/Rot	Dako, Hamburg, DE
Helicobacter Pylori Schnelltest (Serum)	Diagnostik Nord, Schwerin, DE
EnVision™ Kit	Dako, Hamburg, DE
High-capacity reverse-transcription kit	Applied Biosystems by Life Technologies, Ober-Olm, DE
LEGENDplex™ human Th1/Th2 Cytokines	Biolegend, Fell, DE
peqGOLD® Gel Extraction Kit	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE
Pronto Dry - Urease Schnelltest für <i>Helicobacter Pylori</i>	Mediasafe, Wentorf, DE
RIDASCREEN® Helicobacter IgG ELISA	R-Biopharm, Darmstadt, DE
Streptavidin/Biotin Blockierungskit	Vector, Biozol, Eching, DE
Titan One Tube RT-PCR System -5x RT-PCR-Buffer -Enzym-Mix (Reverse Transkriptase, AMV) -DTT (100mM)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE

Bezeichnung	Hersteller
peqGOLD® Plasmid Miniprep I Kit	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE
recomLine Helicobacter IgG	Mikrogen, Neuried, DE
RNeasy® Micro Kit (50)	Qiagen, Hilden, DE
QIAquick® Gel Extraction Kit (250)	Qiagen, Hilden, DE
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Qiagen, Hilden, DE

4.1.6. Antikörper

Immunhistochemie

Tabelle 4-6 Verwendete Antikörper in der Immunhistochemie

Antikörper	Klon	Spezies	Hersteller
α -MUM1	Mum-1p	Maus	Dako, Hamburg, DE
α -iNOS	polyklonal	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
Biotinylierte α -Kaninchen IgG oder α -Maus IgG	polyklonal	Esel	Dianova, Hamburg, DE

Durchflusszytometrie und FACS

Für den durchflusszytometrischen Nachweis von Oberflächen- oder intrazellulären Markern wurden folgende monoklonale Antikörper, die direkt mit Fluorochromen konjugiert waren, verwendet (Tab. 4-7).

Tabelle 4-7 Verwendete Antikörper in der Durchflusszytometrie

Spezifität	Klon	Fluorochrom-Konjugat	Hersteller
CD3	SK7	Allophycocyanin-H7 (APC-H7)	BD, Heidelberg, DE
CD3	UCHT1	APC	eBiosciences, Frankfurt am Main, DE
CD3	UCHT1	Pacific Blue (PacB)	BD, Heidelberg, DE
CD14	M ϕ P9	APC-H7	BD, Heidelberg, DE
CD14	M5E2	PacB	BD, Heidelberg, DE
CD19	SJ25C1	Phycoerythrin-Cyanine7 (PE-Cy7)	BD, Heidelberg, DE
CD19	HIB19	APC	BD, Heidelberg, DE
CD19	HIB19	V500	BD, Heidelberg, DE
CD20	2H7	Peridinin-chlorophyll-protein complex (PerCp)	eBiosciences, Frankfurt am Main, DE
CD20	HI47	Pacific Orange (PacO)	Invitrogen von Life Technologies, Ober-Olm, DE
CD20	2H7	Brilliant Violet 510	BD, Heidelberg, DE
CD27	O323	PE	eBiosciences, Frankfurt am Main, DE
CD27	L128	APC	BD, Heidelberg, DE
CD38	HIT-2	PerCpCy5.5	BD, Heidelberg, DE
CD38	HIT-2	PE-Cy7	BD, Heidelberg, DE
IgA	IS11-8E10	APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
IgA	IS11-8E10	FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
IgG	G18-145	APC-H7	BD, Heidelberg, DE
iNOS	C11	Alexa Flour 405	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, DE

Spezifität	Klon	Fluorochrom-Konjugat	Hersteller
IL-1 β	AS10	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	BD, Heidelberg, DE
IL-2	MQ1-17H12	PE	BD, Heidelberg, DE
IL-4	8D4-8	PE	BD, Heidelberg, DE
IL-6	MQ2-6A3	FITC	BD, Heidelberg, DE
IL-8	AS14	FITC	BD, Heidelberg, DE
IL-10	JES3-9D7	Alexa Fluor 647	eBiosciences, Frankfurt am Main, DE
TNF- α	MAb11	PE	BD, Heidelberg, DE
IFN- γ	B27	FITC	BD, Heidelberg, DE

Tabelle 4-8 Verwendete Isotyp-Kontrollantikörper in der Durchflusszytometrie

Spezifität	Isotyp	Konjugation	Klon	Herkunft	Hersteller
Isotyp-kontrollen	IgG1	APC	MOPC-21	Maus	BD, Heidelberg, DE
	IgG1	PE	MOPC-21	Maus	BD, Heidelberg, DE
	IgG1	PerCpCy5.5	X40	Maus	BD, Heidelberg, DE
	IgG1	PE-Cy7	P3.6.2.8.1	Maus	eBiosciences, Frankfurt am Main, DE

ELISA**Tabelle 4-9 Verwendete Antikörper für ELISA**

Antikörper	Konzentration	Spezies	Hersteller
Serum IgG1	2 mg/ml	Mensch	Sigma-Aldrich, München, DE
α -humanes IgG (Fc γ -spezifisch)	1,2 mg/ml	Ziege	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
α -humanes IgG-Peroxidase	0,8 mg/ml	Ziege	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK

4.1.7. Primer

Tabelle 4-10 Primer für ‘nested’ PCR der schweren Kette (IgH)

Primer für externe PCR (100 pmol/µl)	
VH1 LC ^{5'} CC ATG GAC TGG ACC TGG A ^{3'}	} (179)
VH2 LC ^{5'} ATG GAC ACA CTT TGC T(AC)C AC ^{3'}	
VH3 LC ^{5'} CC ATG GAG TTT GGG CTG AGC ^{3'}	
VH4 LC ^{5'} ATG AAA CAC CTG TGG TTC TT ^{3'}	
VH5 LC ^{5'} ATG GGG TCA ACC GCC ATC CT ^{3'}	
VH6 LC ^{5'} ATG TCT GTC TCC TTC CTC AT ^{3'}	
für IgA: IgVH-ca ^{5'} GGA AGA AGC CCT GGA CCA GGC ^{3'} (180)	
für IgG: Ecγ ^{5'} AC GCC GCT GGT CAG GGC GC ^{3'}	
für IgM: Ecμ ^{5'} TCA GGA CTG ATG GGA AGC CC ^{3'}	
Primer für interne PCR (100 pmol/µl)	
VH1 FM ^{5'} CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG ^{3'}	} (181)
VH2 FM ^{5'} CAG GTC ACC TTG AAG GAG TCT GG ^{3'}	
VH3 FM ^{5'} GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG ^{3'}	
VH4 FM ^{5'} CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG ^{3'}	
VH5 FM ^{5'} GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG ^{3'}	
VH6 FM ^{5'} CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG ^{3'} (181)	
für IgA: IgAex2 ^{5'} ACC AGG CAG GCG ATG ACC AC ^{3'}	
für IgG: IgGex* ^{5'} AAG TAG TCC TTG ACC AGG CAG C ^{3'} (181)	
für IgM: IgMin,neu ^{5'} AGG AGA CGA GGG GGA AAA GGG TTG ^{3'} (181)	
Primer für spezifische interne PCR (100 pmol/µl)	
5' AgeI VH1 ^{5'} CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG ^{3'}	
5' AgeI VH1/5 ^{5'} CTGCAACCGGTGTACATTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG ^{3'}	
5' AgeI VH3 ^{5'} CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG ^{3'}	
5' AgeI VH3-23 ^{5'} CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG ^{3'}	
5' AgeI VH4 ^{5'} CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG ^{3'}	
5' AgeI VH 4-34 ^{5'} CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG ^{3'}	
5' AgeI VH 1-18 ^{5'} CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTTTCAGCTGGTGCAG ^{3'}	
5' AgeI VH 1-24 ^{5'} CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTCCAGCTGGTACAG ^{3'}	
5' AgeI VH3-33 ^{5'} CTGCAACCGGTGTACATTCTCAGGTGCAGCTGGTGGAG ^{3'}	
5' AgeI VH 3-9 ^{5'} CTGCAACCGGTGTACATTCTGAAGTGCAGCTGGTGGAG ^{3'}	
5' AgeI VH4-39 ^{5'} CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAG ^{3'}	
5' AgeI VH 6-1 ^{5'} CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTACAGCTGCAGCAG ^{3'}	
Sall JH 1/2/4/5 ^{5'} TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCAG ^{3'}	
Sall JH 3 ^{5'} TGCGAAGTCGACGCTGAAGAGACGGTGACCATTG ^{3'}	
Sall JH 6 ^{5'} TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCGTG ^{3'}	

Tabelle 4-11 Primer für ‘nested’ PCR’ der leichten Kette (Igκ)

Primer für externe PCR (100 pmol/μl)	
5' L Vκ ½	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG ^{3'}
5' L Vκ 3	CTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG ^{3'}
5' L Vκ 4	ATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG ^{3'}
3' Cκ 543	GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCA ^{3'}
Primer für interne PCR (100 pmol/μl)	
5' Pan Vκ	ATGACCCAGWCTCCABYCWCCTG ^{3'}
3' Cκ 494	GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCT ^{3'}
Primer für spezifische interne PCR (100 pmol/μl)	
5' AgeI Vκ 1-5	CTGCAACCGGTGTACATTCTGACATCCAGATGACCCAGTC ^{3'}
5' AgeI Vκ 1-9	TTGTGCTGCAACCGGTGTACATTCAGACATCCAGTTGACCCAGTCT ^{3'}
5' AgeI Vκ 1D-43	CTGCAACCGGTGTACATTGTGCCATCCGGATGACCCAGTC ^{3'}
5' AgeI Vκ 2-24	CTGCAACCGGTGTACATGGGGATATTGTGATGACCCAGAC ^{3'}
5' AgeI Vκ 2-28	CTGCAACCGGTGTACATGGGGATATTGTGATGACTCAGTC ^{3'}
5' AgeI Vκ 2-30	CTGCAACCGGTGTACATGGGGATGTTGTGATGACTCAGTC ^{3'}
5' Age Vκ 3-11	TTGTGCTGCAACCGGTGTACATTCAGAAATTGTGTTGACACAGTC ^{3'}
5' Age Vκ 3-15	CTGCAACCGGTGTACATTCAGAAATAGTGATGACGCAGTC ^{3'}
5' Age Vκ 3-20	TTGTGCTGCAACCGGTGTACATTCAGAAATTGTGTTGACGCAGTCT ^{3'}
5' Age Vκ 4-1	CTGCAACCGGTGTACATTCGGACATCGTGATGACCCAGTC ^{3'}
3' BsiWI Jκ 1/4	GCCACCGTACGTTTGATYTCCACCTTGGTC ^{3'}
3' BsiWI Jκ 2	GCCACCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTC ^{3'}
3' BsiWI Jκ 3	GCCACCGTACGTTTGATATCCACTTGGTC ^{3'}
3' BsiWI Jκ 5	GCCACCGTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTC ^{3'}

Tabelle 4-12 Primer für ‘nested’ PCR’ der leichten Kette (Igλ)

Primer für externe PCR (100 pmol/μl)	
5' L Vλ 1	GGTCCTGGGCCCAGTCTGTGCTG ^{3'}
5' L Vλ 2	GGTCCTGGGCCCAGTCTGCCCTG ^{3'}
5' L Vλ 3	GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG ^{3'}
5' L Vλ 4/5	GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG ^{3'}
5' L Vλ 6	GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG ^{3'}
5' L Vλ 7	GGTCCAATTCYCAGGCTGTGGTG ^{3'}
5' L Vλ 8	GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG ^{3'}
3' Cλ	CACCAGTGTGGCCTTGTTGGCTTG ^{3'}
Primer für interne und spezifische PCR (100 pmol/μl)	
5' AgeI Vλ 1	CTGCTACCGGTTCTGGGCCCAGTCTGTGCTGACKCAG ^{3'}
5' AgeI Vλ 2	CTGCTACCGGTTCTGGGCCCAGTCTGCCCTGACTCAG ^{3'}
5' AgeI Vλ 3	CTGCTACCGGTTCTGTGACCTCCTATGAGCTGACWCAG ^{3'}
5' AgeI Vλ 4/5	CTGCTACCGGTTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTGACTCA ^{3'}
5' AgeI Vλ 6	CTGCTACCGGTTCTTGGGCCAATTTTATGCTGACTCAG ^{3'}
5' AgeI Vλ 7/8	CTGCTACCGGTTCCAATTCYCAGRCTGTGGTGACYCAG ^{3'}
3' XhoI Cλ	CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG ^{3'}

Tabelle 4-13 Primer für Kontroll-PCR nach Transformation

Primer für Kontroll-PCR (100 pmol/µl)	
5' Absense	^{5'} GCTTCGTTAGAACGCGGCTAC ^{3'}
für IgH : 3'IgG internal	^{5'} GTTCGGGGAAGTAGTCCTTGAC ^{3'}
für Igκ: 3'Cκ494	^{5'} GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCT ^{3'}
für Igλ: 3'Cλ	^{5'} CACCAGTGTGGCCTTGTTGGCTTG ^{3'}

4.1.8. Organismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, Bakterienstämme und Plasmide sind mit ihren relevanten phäno- oder genotypischen Eigenschaften sowie der Herkunft in den Tabellen 4-14, 4-15 und 4-16 aufgeführt.

4.1.8.1. Zelllinien

Tabelle 4-14 Zelllinien und relevante Eigenschaften

Zelllinie	Relevante Eigenschaften	Referenz/Herkunft
B-LZL	iNOS Expression	Herstellung mittels PBMCs einer gesunden Kontrolle
HEK-293T		DSMZ, Braunschweig

4.1.8.2. Bakterienstämme

Tabelle 4-15 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Relevante Eigenschaften	Referenz/Herkunft
<i>Escherichia coli</i> TOP10	chemokompetent	Charité-Universitätsmedizin Berlin, Übernahme von Dr. Ulrike Erben
<i>Helicobacter pylori</i> P12 wt	cagA ⁺ , vacA ⁺	Fischer et al., 2010 (182), MPI Infektionsbiologie, AG Thomas F. Meyer, Übernahme von Kirstin Hoffmann,

4.1.8.3. Plasmide

Tabelle 4-16 Plasmide

DNA Plasmid	Größe (kbp)	Relevante Eigenschaften	Referenz/Herkunft
pγI HC	5,5	Humanes IgG1 schwere Kette konstante Region, Ap ^R , HCMV-Promotor, AgeI- und Sall-Klonierungsstelle	Tiller et al., 2008 (178), MPI Infektionsbiologie, AG Hedda Wardemann, Übernahme von Cornelia Kreschel
pκLC	5,0	Humanes IgG1 κ leichte Kette konstante Region, Ap ^R , HCMV-Promotor, AgeI- und BsiWI-Klonierungsstelle	
pλLC	5,0	Humanes IgG1 λ leichte Kette konstante Region, Ap ^R , HCMV-Promotor, AgeI- und XhoI-Klonierungsstelle	

*Ap^R, Ampicillin-Resistenz

4.1.9. Software

Die verwendeten Software-Programme wurden in Tabelle 4-17 zusammengefasst.

Tabelle 4-17 Software

Software	Hersteller
FCAP Array 3.0	BD, Heidelberg, DE
FlowJo 8.8.4	TreeStar, Ashland, US
GraphPad Prism 5 und 6	GraphPad, San Diego, CA, US
LEGENDplex TM data analysis software	Biolegend, Fell, DE
JOINSOLVER [®]	(http://joinsolver.niams.nih.gov), National Institutes of Health, USA
Chromas 2.33 sequence viewer	Chromas Technelysim, Helensvale, AUS
Microsoft Excel 2010	Santa Rosa, CA, USA

4.2. Methoden

4.2.1. Patienten und Proben

Die Ethikkommission der Charité hat diesem Forschungsvorhaben zugestimmt und die schriftliche Zustimmung jedes einzelnen Patienten wurde nach einem Aufklärungsgespräch erhalten. Es wurden Biopsate aus dem Antrum der Magenmukosa entnommen und konsekutiv von 48 Patienten gesammelt, die sich einer Gastroskopie unterzogen haben (Tab. 4-18). Patientenproben wurden je nach histopathologischen Resultaten einer Warthin-Starry's Silberfärbung und dem schnellen Urease-Test von Biopsaten *H. pylori*-positive Patienten ($n = 24$) und *H. pylori*-negative Patienten ($n = 24$) eingeteilt. Zusätzlich wurde von den Patienten ca. 10 ml heparinisiertes Blut abgenommen und untersucht. Weiterhin wurden duodenale Biopsate von unbehandelten Patienten mit Infektionen mit *Tropheryma whipplei* ($n = 10$), humanem Immundefizienz Virus (HIV) ($n = 10$), oder *Giardia duodenalis* (syn. *G. lamblia*) ($n = 10$) mittels Immunhistochemie untersucht (Tab. 4-18).

Tabelle 4-18 Patientenübersicht der verwendeten Proben

	<i>H. pylori</i> -positive Patienten	<i>H. pylori</i> -negative Patienten	<i>Tropheryma whipplei</i> Patienten	HIV Patienten	<i>Giardia duodenalis</i> Patienten
No.	24	24	10	10	10
Alter, Median (Spanne)	53 (20-78)	53 (29-84)	57 (42-67)	51 (34-75)	48 (38-74)
Geschlecht, m/w	9/15	7/17	9/1	7/3	8/2
Gewebe-Analyse					
Herkunft	Antrum	Antrum	Duodenum	Duodenum	Duodenum
Histologie			10	10	10
Durchflusszytometrie	19	24			
FACS					
Einzellzellsortierung	3				
Sortierung	2				
Biopsieüberstände	15	15			
Blut-Analyse					
Durchflusszytometrie	13	13			
FACS	2				
Ficollüberstände	15	15			

4.2.2. Zellkultur

4.2.2.1. Aufarbeitung von humanen Biopsaten aus dem Antrum

Während einer Gastroskopie wurden den Patienten zehn bis zwölf Magenbiopsate aus dem Antrum abgenommen. Bis zur Verwendung wurden die Biopsate in NaCl bei 4°C gelagert. Zum einen wurden frisch isolierte Biopsate direkt für die Isolierung von Lamina propria Lymphozyten (LPLs) verwendet. Zum anderen wurden drei Biopsate über einen Zeitraum von 48 Stunden kultiviert (s. 4.2.2.6. Kurzzeitkultivierung von Antrumbiopsaten) und je eine Biopsat für histologische Untersuchungen fixiert (s. 4.2.3. Immunhistochemische Färbungen).

4.2.2.2. Präparation von Lamina propria Lymphozyten

Biopsate von *H. pylori*-negative Kontrollen und *H. pylori*-positiven Patienten wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierzu wurden LPLs aus den Magenbiopsaten mittels Verdau durch Kollagenase Typ II-S isoliert (183). Die Biopsate wurden in LPL-Medium, 0,5 mg/ml Kollagenase Typ II-S (steril filtriert), 0,1 mg/ml Trypsin Inhibitor und 0,1 mg/ml DNase I für 15 min bei 37°C und 5 % CO₂ unter langsamen Schütteln inkubiert. Gewebefragmente wurden anschließend unter Anwendung einer 10-cm³ Einwegspritze und einer stumpfen 18G-Nadel weiter zerkleinert. LPLs wurden von den epithelialen Zellen mit Hilfe einer Percoll-Gradientenzentrifugation separiert (35 %/60 %; 20-30 min, 2000xg, ohne Bremse).

4.2.2.3. Zellseparation primärer mononukleärer Blutzellen

Das Spenderblut wurde in heparinbeschichteten Vacutainer-Röhrchen entnommen, bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 12 Stunden verarbeitet. Zur Gewinnung der peripheren mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) aus frischem Vollblut von Kontrollen und Patienten wurde die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation benutzt. Ficoll ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, dessen Dichte so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate, die meisten Granulozyten und tote Zellen die Ficollschicht passieren und sedimentieren. Die mononukleären Zellen reichern sich in der Interphase zwischen Ficoll und Plasma an.

Es wurden 3 ml Ficoll Paque in ein LeucoSep-Röhrchen mit Filterscheibe gegeben und kurz zentrifugiert, damit sich das Ficoll unterhalb der Filterscheibe befand. Danach wurden vorsichtig 4-5 ml Blut auf die Filterscheibe gegeben und anschließend das Röhrchen für 10 min zentrifugiert (2100xg, RT, ohne Bremse). Das Plasma wurde abgenommen und in Einfrierröhrchen bei -20°C gelagert. Anschließend wurde die mononukleäre Zellschicht sehr vorsichtig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden in PBS/BSA resuspendiert und bei 650xg für 7 min bei 4°C zentrifugiert. Erythrozyten wurden durch fünfminütige Inkubation in 5 ml Erylysepuffer bei RT lysiert. Dieser Puffer wurde durch einen weiteren Waschschriff mit PBS/BSA entfernt.

4.2.2.4. Generierung einer B-lymphoblastoiden Zelllinie

Bei lymphoblastoiden B-Zelllinien (B-LZL) handelt es sich um humane BZ, die mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) transfiziert und dadurch immortalisiert wurden. Kulturüberstände mit einem hohen Titer an Epstein-Barr-Viruspartikeln (EBV) wurde von einer Standardkultur der Marmosetten Lymphozyten-Zelllinie B95-8 (DSMZ ACC 100; Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany) gewonnen. Für die Generierung der B-LZL wurden 3×10^6 gereinigte PBMCs in BZ-Medium (20 % FCS) kultiviert. Kulturen erhielten das gleiche Volumen an Virus-enthaltendem Überstand und 600 ng/ml Cyclosporin A. Jeden dritten oder vierten Tag wurde 1 ml der Kultur mit frischem Cyclosporin A-haltigem Medium ersetzt. Die Kulturen wurden für 4 bis 6 Wochen in einem Brutschrank (5 % CO₂ bei 37°C). Proliferierende Zellen wurden für CD19-Allophycocyanin gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht (FACSCalibur, s. 4.2.4. Phänotypisierung humaner B-Zellen und Plasmazellen mittels Durchflusszytometrie). Verifizierte B-LZL wurden kultiviert in B-Medium mit 10 % FCS und ohne Cyclosporin A.

4.2.2.5. Bestimmung der Lebendzellzahl

10 µl der Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen einer 2 %igen Trypanblau-Lösung gemischt. Dieser Farbstoff dient der tot/lebend-Differenzierung, da er nur bei toten Zellen die Zellmembran durchdringen und das Zytoplasma blau färben kann. 10 µl dieser Mischung wurden in die Zählkammer eingefüllt und viermal 16 Felder (vier Großquadrate) ausgezählt. Anhand folgender Gleichung wurde aus dem Mittelwert der Zählungen durch Multiplikation des Verdünnungsfaktors (Vf) und des Kammerfaktors (10^4) die Zellzahl/ml berechnet.

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

4.2.2.6. Kurzzeitkultivierung von Antrumbiopsaten

Für die Bestimmung der Zytokin- und Antikörperproduktion wurden Magenbiopsaten über einen Zeitraum von 48 Stunden bei 5 % CO₂ und 80 % O₂ im Brutschrank bei 37°C auf passenden Sieben kultiviert. Das Gewicht der Biopsate wurde mit einer Analysewaage bestimmt und die Biopsate in eine 12-Well-Kulturplatte mit 1000 µl LPL-Medium überführt. Der Kulturüberstand wurde nach 48 Stunden abgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.2.7. Messung von Zytokinen und Immunglobulinen in humanen Blutseren und Biopsieüberständen

Um die Zytokin- bzw. Ig-Konzentrationen in humanen Blutseren und Biopsieüberständen zu bestimmen, wurden diese nach den Vorgaben des Herstellers in einem BioLegend LEGENDplex™ oder einem BD™ Cytometric Bead Array (CBA) eingesetzt. Die Analyse erfolgte mittels durchflusszytometrischer Messung am FACS CantoII. Die Daten wurden anschließend quantitativ mit Hilfe der LEGENDplex™ Software bzw. FCAP Array™ ausgewertet. Die beiden Assays sind Partikel-basierte Immunoassays, die auf dem Prinzip des Sandwich-Immunoassays beruhen. Die Partikel werden über die Größe und über die interne Fluoreszenzintensität unterschieden (Tab. 4-19). Jedes Partikel-Set ist mit einem spezifischen Antikörper auf der Oberfläche konjugiert und dient als Erfassungspartikel für dieses bestimmte Analyt. Wenn ein ausgewähltes Set von Erfassungspartikeln mit der Probe inkubiert wird, binden die Analyte an ihre spezifischen Erfassungspartikel. Nach dem Waschen wurde ein Detektionsantikörpermix zugegeben und jeder Detektionsantikörper in dem Mix bindet an sein spezifisches Analyt, gebunden an der Oberfläche der Erfassungspartikel. In dem LEGENDplex Kit sind die Detektionsantikörper biotinyliert und Streptavidin-phycoerythrin (SA-PE) wurde anschließend zugegeben, welches an die biotinylierten Detektionsantikörper bindet und damit eine Fluoreszenzintensität entsprechend der Menge des gebundenen Analytes generiert wird. Der Unterschied beim CBA besteht darin, dass der Detektionsantikörper direkt mit PE gekoppelt ist. Die Konzentrationsbestimmungen der jeweiligen Analyte wurden durch die Anfertigung einer Standardverdünnungsreihe für jedes Experiment durchgeführt. Die bei -80°C gelagerten Biopsieüberstände und Serumproben wurden bei 4°C ü. N. aufgetaut.

Tabelle 4-19 Übersicht der nachgewiesenen Zytokine und Immunglobulinklassen in Seren und Biopsie-Überständen

Zytokin/ Immunglobulin	Partikelpopulation	Nachweissystem
IL-2	A6	Legendplex
IL-4	B6	Legendplex
IL-5	A4	Legendplex
IL-6	A7	Legendplex
IL-10	A10	Legendplex
IL-13	A5	Legendplex
IFN- γ	B2	Legendplex
TNF- α	B3	Legendplex
Total IgG	C6	CBA
IgM	C8	CBA
IgA	C9	CBA

Die Messung von spezifischen IgG-Antikörpern gegen *H. pylori* erfolgte entsprechend den Herstellerangaben des RIDASCREEN® Helicobacter IgG ELISAs. Die Quantifizierung erfolgte durch eine Positiv- und Negativkontrolle mit definierten Werten.

4.2.3. Immunhistochemische Färbungen

Duodenale Biopsate von unbehandelten Patienten infiziert mit *T. whipplei* ($n = 10$), HIV ($n = 10$), und *G. duodenalis* ($n = 10$) wurden mittels Immunhistochemie analysiert.

4.2.3.1. Präparation der Biopsate

Unverzüglich nach der Gastroskopie wurden die Biopsate in 4 % Paraformaldehyd in PBS für 3 h bei Raumtemperatur fixiert und anschließend in einem automatisiertem Verfahren in Paraffin eingebettet, wobei die Dehydratisierung mit aufsteigender Ethanolreihe gefolgt von Xylol, Xylol- und Paraffinmischung und schließlich Paraffin in einem Übernacht-Prozess erfolgte. Anschließend wurden die Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten (FFPE) Biopsate in 3 μ m dünne Scheiben geschnitten, in ein 60°C Wasserbad überführt und auf ein Objektträger gezogen. Nach dem Trocknen konnten die Proben bis zur Immunohistochemischen Analyse bei Raumtemperatur gelagert werden.

4.2.3.2. Entparaffinisierung und Antigen-Wiederherstellung

Für die Immunhistochemie standen Objektträger mit Dünnschnitten von formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Biopsate des Duodenums von Patienten Verfügung. Zur Entparaffinisierung wurden die Objektträger dreimal für je fünf Minuten in Xylol inkubiert, um dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100 % - 70 % Ethanol) rehydriert zu werden. Bei der Fixierung der Biopsate mit Formalin kann es zur Konformationsänderung der antigenen Bindungstellen (Epitope) kommen. Daraus kann ein partieller oder vollständiger Verlust der Immunreaktivität resultieren. Zur Wiederherstellung der Reaktivität (Demaskierung) der Epitope wurden die Objektträger für zwei Minuten in Zitratpuffer (10 mM, pH 6) in einem Dampfdrucktopf gekocht.

4.2.3.3. Antikörperfärbungen

Die Färbungen erfolgten in einer Feuchtkammer, damit die Schnitte nicht austrocknen. Es wurden Kontrollen sowohl nur mit Primärantikörper als auch nur mit Sekundärantikörper bei allen Färbungen mitgeführt, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Die Konzentrationen und Inkubationszeiten der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tab. 4-20 zusammengestellt. Färbungen wurden mittels biotinylierten Esel-anti-Kaninchen Antikörper, Streptavidin-alkalische Phosphatase und Fast red oder EnVision™ visualisiert.

Tabelle 4-20 Protokollübersicht der nachgewiesenen Proteine in der Histochemie

Antigen	Primär-antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit	Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit
MUM1	Maus- α -humanes MUM1	1:25	2 h, RT	Envision™ Kit		30 min, RT
iNOS	Kaninchen- α -humanes iNOS	1:200	1 h, RT	Esel- α -Kaninchen-Biotin	1:400	30 min, RT

Alle Reagenzien wurden entsprechend Tabelle 4-20 in Antikörperversdünnungspuffer verdünnt und je 50 μ l auf jeden Schnitt aufgetragen. Um die Signalstärke zu erhöhen, wurden für die Färbungen der α -Kaninchen Antikörper biotinylierte Sekundärantikörper verwendet, die im nächsten Schritt mit einem Streptavidin-Enzymkomplex reagierten. Streptavidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin und kann so die Farbreaktion des Substrates um ein Vielfaches erhöhen (Abb. 4-1). Für die Färbung des MUM1 Antikörpers wurde das EnVision™-Kit von Dako verwendet. Hierbei wird ein Polymer-gebundener Sekundärantikörper für mindestens 30 min inkubiert. Das Antigen wurde schließlich mittels dem DAB Chromogen sichtbar gemacht. Bei der Doppelfärbung wurde zunächst MUM1 gefärbt und anschließend iNOS.

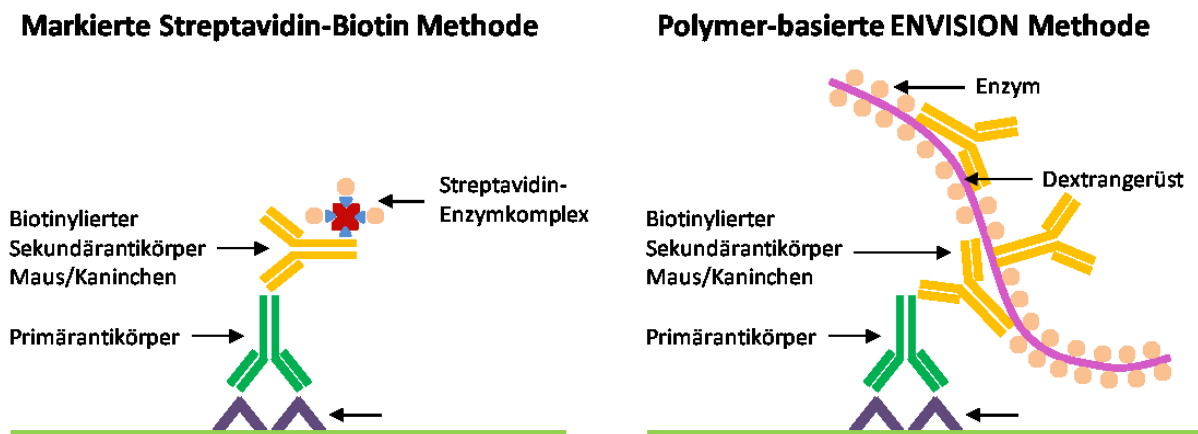


Abbildung 4-1 Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbemethoden von Dako
Links Markierte Streptavidin-Biotin Methode. Primärantikörper binden spezifisch ein bestimmtes Gewebe-Antigen. Sekundärantikörper sind konjugiert mit Biotin-Molekülen, die eine hohe Affinität zu Streptavidin haben. Streptavidin ist konjugiert mit Alkalischer Phosphatase, welche die Farbreaktion katalysiert. Als Substrat wurde das Real Detektionskit von Dako gemäß den Vorgaben des Herstellers verwendet.

Rechts Zwei-Schritt Polymer-basierte Envision™-Methode. Sekundärantikörper sind mit einem Polymer konjugiert, einem Gerüst aus Dextran gekoppelt mit bis zu 70 Enzymmolekülen, wie Meerrettich-Peroxidase.

Die Proben wurden mit Hämatoxylin für mindestens zehn Sekunden gegengefärbt. Um den Schnitt zu schützen und zu analysieren wurde die Probe mittels Kaisers Glycingelatine und Deckgläschen abgedeckt.

Positive Zellen wurden als Mittel der Zellzahl von drei bis zehn Gesichtsfeldern (GF) von je $0,237 \text{ mm}^2$ bestimmt.

4.2.4. Phänotypisierung humaner B-Zellen und Plasmazellen mittels Durchflusszytometrie

Zur Phänotypisierung der in den isolierten LPLs und PBMCs enthaltenen BZ und PZ wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle sowie intrazellulärer Moleküle untersucht. Dazu wurde die Durchflusszytometrie genutzt, welche in ihrer einfachsten Form auf der Messung von Streulicht beruht. Die in einer Suspension vorliegenden Zellen werden dabei mittels einer hydrodynamischen Fokussierung perlenkettenartig angeordnet und passieren einzeln einen Laserstrahl.

Dabei streuen sie abhängig von ihrer Zellgröße und –beschaffenheit (z.B. Granularität) das eintreffende Licht. Das Vorwärtstreulicht (*forward light scatter, FSC*), dessen Intensität in einem Winkel von 0° zum Laserstrahl mittels eines Detektors ermittelt wird, gibt Auskunft über die Zellgröße. Das Seitwärtstreulicht (*sideward light scatter, SSC*) hingegen wird in einem Winkel von 90° zum Laserstrahl gemessen und lässt Rückschlüsse auf die Granularität der Zelle zu. Bereits durch die Auftragung von SSC gegen FSC ist es möglich, die Zelltypen einer heterogenen Zellpopulation zu unterscheiden (Abb. 4-2.).

Die erweiterte Form der Durchflusszytometrie beruht zusätzlich auf der Messung von Fluoreszenzsignalen und ermöglicht eine quantitative Expressionsanalyse. Dazu werden die Zellen mit monoklonalen Primär-Antikörpern, welche gegen membrangebundene oder intrazelluläre Moleküle gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, gefärbt.

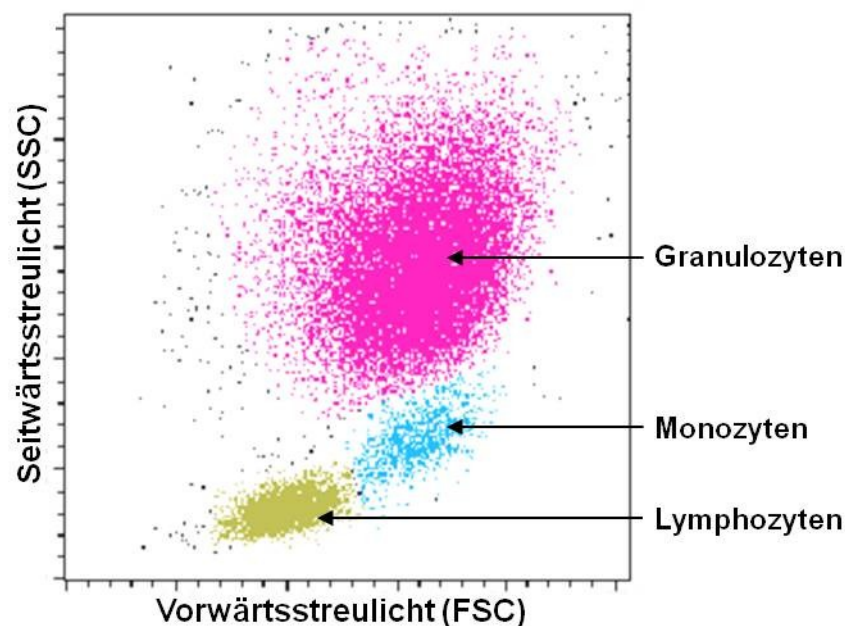


Abbildung 4-2 Schematische Darstellung der Zellpopulationen im FSC/SSC-Dot Plot

Der Fluoreszenzfarbstoff absorbiert monochromatisches Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge und emittiert anschließend längerwelliges Licht (Fluoreszenz), dessen Intensität mittels eines Detektors (Photomultiplier) bestimmt wird und proportional zur Menge an gebundenem Antikörper ist. Bei Verwendung von Tandem-Farbstoffen, die sich aus zwei konjugierten Farbstoffen zusammensetzen, wird durch das emittierte Licht der zweite Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt und erst diese Intensität detektiert. Durch die gleichzeitige Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen, deren Emissionsmaxima sich unterscheiden, sowie den Einsatz verschiedener Laser, dichromatischer Spiegel- und optischer Filtersysteme und Detektoren kann die Expression mehrerer Moleküle einer Zelle simultan ermittelt werden. Dargestellt werden können die ermittelten Signale in Punktdiagrammen (*dot plots*) oder Histogrammen. In den Punktdiagrammen repräsentiert jeder Punkt eine Zelle. Am FacsCantoII konnten Zellaggregate ausgeschlossen werden, in dem im *forward* und *side light scatter* die Weite gegen die Fläche aufgetragen wurde. Durch das Setzen von Analysefenstern (*Gating*) kann die Expressionsanalyse auf bestimmte Zellpopulationen beschränkt werden. Um die Populationsgrenzen zu bestimmen wurden FMO (*fluorescence minus one*) Kontrollen durchgeführt, d.h. es wurde jeweils ein Antikörper weggelassen.

Die in der Magenmukosa und im peripheren Blut vorkommenden mBZ (CD19⁺, CD20⁺, CD27⁺, CD38⁻, CD3⁻, CD14⁻) und PZ (CD19⁺, CD27⁺⁺, CD38⁺⁺, CD20⁻, CD3⁻, CD14⁻) wurden hinsichtlich ihrer prozentualen Verteilung und der Expression der Moleküle iNOS, IgA und IgG untersucht.

Die Auswertungen der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo 8.8.4.

4.2.4.1. Analyse von Oberflächenmolekülen

Um Oberflächenmoleküle auf Zellen näher zu charakterisieren, wurden jeweils 50 µl Zellsuspension in PBS/BSA von Patienten und Kontrollen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert. Für die Phänotypisierung der BZ und PZ wurden Antikörper gegen CD3, CD14, CD19, CD20, CD27 und CD38 verwendet. Zu jeder Färbung wurde Beriglobin (aufgereinigtes humanes IgG, 1 µg/ml) hinzugegeben, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Um unspezifische Bindungen des Anti-CD19-Antikörpers mit seinem Fc-Fragment zu erkennen, wurde eine Isotypkontrolle mitgeführt. Der dabei verwendete Antikörper unterschied sich vom Anti-CD19-Antikörper lediglich in seiner Antigen-Spezifität. Er war gegen ein nicht im humanen System vorkommendes Epitop gerichtet. Während der 15-minütigen Inkubation bei 4°C im Dunkeln banden die Antikörper an die entsprechenden Oberflächenmoleküle. Zur Entfernung aller nichtgebundener Antikörper erfolgte nach Zugabe von 1 ml PBS/BSA je Färbeansatz eine 10-minütige Zentrifugation bei 650xg und 4°C. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl PBS/BSA aufgenommen und die Expression der Proteine durchflusszytometrisch mittels FacsCantoII oder FacsCalibur Zytometer bestimmt. Bis zur durchflusszytometrischen Messung wurden die Proben kühl und dunkel gelagert, direkt vor der Messung wurde je Färbeansatz 1 µl 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) zugegeben. Dies ist ein an DNA bindender Fluoreszenzfarbstoff, der in tote und geschädigte Zellen eintreten kann und diese dann anfärbt.

4.2.4.2. Analyse von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Markern

Die Oberflächenfärbung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Um intrazelluläre Moleküle anfärben zu können, wurden die Zellen anschließend fixiert und permeabilisiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200 µl 4 % PFA-Lösung je Pellet und einer 15-minütigen Inkubation im Dunkeln bei 37°C. Um das PFA zu entfernen, wurden die Zellen anschließend in PBA gewaschen (2500xg, 5 min, 4°C). Für die intrazellulären Färbungen wurde eine Färbelösung mit Antikörpern, Beriglobin, Saponin (0,5 %) und PBA angesetzt. Saponin ist ein pflanzliches Detergenz, welches reversibel die Zellmembran perforiert und somit die Detektion intrazellulärer Moleküle ermöglicht. Die Zellen wurden mit 50 µl Färbelösung für 15 min inkubiert (RT, im Dunkeln). Anschließend wurden die Zellen mit PBA gewaschen, in 200 µl PBA aufgenommen und die Expression der Proteine durchflusszytometrisch bestimmt.

Für den Nachweis intrazellulärer Zytokine wurden die Zellen vor der Färbung für 3 h mit 10 µg/ml Brefeldin A inkubiert. Brefeldin A induziert retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum, wodurch es zu einer Akkumulation von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum kommt, die sezerniert werden sollten.

4.2.4.3. Nachweis intrazellulärer Stickstoffmonoxid-Produktion

Für den Nachweis lebender NO-produzierender Zellen wurde 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein (DAF-FM) Diacetat zu der Färbelösung hinzugegeben (25 µM) und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (184). Die Spezifität von DAF-FM für NO ist sehr hoch, denn Diaminofluorescein (DAF) reagiert in neutraler Lösung nicht mit freien und stabil oxidierten Formen von NO, wie NO_2^- und NO_3^- , oder anderen reaktiven Sauerstoffspezies, wie O_2^- , H_2O_2 und ONOO^- . Unter physiologischen Bedingungen wird Triazolofluorescein nicht in Abwesenheit von NO gebildet (185). Nach dem Waschen mit PBS/BSA und einer 20-minütigen Inkubation im Dunkeln bei 4°C, wurde kurz vor der durchflusszytometrischen Messung DAPI zu den Zellen gegeben, um tote Zellen auszuschließen.

4.2.4.4. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) stellt eine Erweiterung der Durchflusszytometrie dar, bei welcher die Zellen sowohl analysiert als auch sortiert werden. Haben die Zellen den Laser passiert, werden sie alle mittels eines schwingungserzeugenden Piezokristalls in einzelne Flüssigkeitstropfen gehüllt. Tropfen, die Zellen enthalten, die einem vorgegebenen Expressionsprofil entsprechen und daher vom Gerät erkannt werden, werden daraufhin elektrisch geladen. Dadurch wird der Flüssigkeitstropfen in einem elektrischen Feld seitlich abgelenkt und somit die enthaltene Zelle in ein Reaktionsgefäß oder eine Vertiefung einer 96-Well-Platte sortiert.

4.2.5. Quantitative real-time PCR zum Messen von Zytokin-mRNA Level

Die quantitative real-time PCR (qPCR) ist eine sensitive Methode zur Quantifizierung von RNA. Im Gegensatz zur kompetitiven PCR bietet die qPCR den Vorteil des hohen Probendurchsatzes und der Quantifizierung von Proben mit wenig Ausgangsmaterial.

4.2.5.1 Sortieren der Zellen und RNA Isolierung (Gesamt-RNA)

Isolierte LPLs und PBMCs wurden mit Antikörpern gegen PZ- und BZ-Oberflächenmarker gefärbt. 10^2 - 10^4 PZs (DAPI⁻CD3⁻CD14⁻CD19⁺CD20⁻CD27⁺⁺CD38⁺⁺) und mBZs (DAPI⁻CD3⁻CD14⁻CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD38⁻) wurden mit einem FACS Aria II sortiert. Den Zellen wurde direkt nach dem Sortieren das 5-10fache Volumen an RNAlater® zugegeben und bis zur Isolierung der RNA für bis zu 3 Tage bei 4°C gelagert. Die RNA wurde aus den Zellen mit dem peqGOLD RNAPure™ laut Herstellerangaben präpariert. Hierzu wurden die Zellen zunächst pelletiert (4.500 rpm, 10 min) und anschließend in 1 ml RNAPure™ mit einer Pipette homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 200 µl Chloroform wurden zugeben, 15 s kräftig geschüttelt, 10 min auf Eis gestellt und bei 4°C, 12.000xg 5 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig in ein frisches Röhrchen überführt, 1 Volumen Isopropanol und 0,8 µl GlycoBlue™ wurden als Fällungshilfe dazugeben, mindestens 15 min auf Eis inkubiert und bei 4°C, 12.000xg 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen (vortexen, bei 4°C, 12.000xg 10 min zentrifugiert), kurz an der Luft bei 37°C getrocknet und in 14 µl ddH₂O gelöst. RNA-Konzentrationen wurden photometrisch am NanoDrop® durch Messung der Absorption bei 260 nm gegen Ultrapureinstwasser bestimmt, wobei 1 OD₂₆₀ einer Konzentration von 40 ng/µl RNA entspricht. Die RNA wurde entweder gleich in cDNA umgeschrieben (s. 4.2.5.2. Reverse Transkription von RNA) oder bei -80°C gelagert.

4.2.5.2. Reverse Transkription von RNA

Die cDNA wurde mithilfe des high-capacity cDNA reverse-transcription Kits nach Herstellerangaben präpariert.

Hierzu wurde ein Reaktionsansatz nach folgendem Schema in einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß auf Eis hergestellt:

- 2 µl 10x RT Puffer
- 2 µl 10x RT Random-Primer
- 0,8 µl 25x dNTP Mix (100 mM)
- 1 µl MultiScribe™ Reverse Transkriptase
- 1 µl RNasin Plus RNase Inhibitor (40 U/µl)

ad 10 µl Nuklease-freies ddH₂O

Dieser Ansatz wurde gut gemischt und 10 µl Gesamt-RNA hinzugegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde direkt in einem Thermocycler für 10 min bei 25°C, dann für 2h bei 37°C und schließlich für 5 min bei 85°C zur Hitze-Inaktivierung inkubiert. Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

4.2.5.3. Quantitative real-time PCR

Die Expressionslevel von fünf Genen wurden mittels TaqMan® real-time PCR nach der TaqMan® assay-basierten Prä-Amplifikation ermittelt. Die cDNA (5 µl, 100 ng) wurde mittels TaqMan® PreAmp Master Mix (2x) und einem Gemisch der verwendeten TaqMan Gene Expression Assays (0,2x) in einem 20-µl PCR-Ansatz prä-amplifiziert. Die Prä-Amplifikationsbedingungen waren wie folgt: 95 °C für 10 min, gefolgt von 10 Zyklen von

95°C für 15 sek und 60°C für 4 min. Eine amplifizierte cDNA-Probe wurde anschließend 1:5 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und je 4,5 µl zusammen mit 0,5 µl TaqMan® Gene Expression Assay und 5 µl 2x TaqMan® Gene Expression Master Mix in eine 96-Well-PCR-Platte pipettiert. Die qPCR Amplifikation wurde mit dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System mit folgenden Bedingungen durchgeführt: 50°C für 2 min und 95°C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen von 95°C für 15 sek und 60°C für 1 min. Die qPCR beinhaltete *GAPDH* als Haushaltsgen, *IFN-γ*, *TNF-α* und *IL-10* als die Gene von Interesse und *IL-6* als Referenzgen.

Für die Quantifizierung wurde die vergleichende C_T (cycle threshold)-Methode ($2^{(-\Delta\Delta C_T)}$) benutzt. C_T bezeichnet die Zyklenzahl, bei welcher die Fluoreszenzintensität einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreitet. Die Normalisierung auf das Haushaltsgen erfolgt durch Subtraktion der C_T -Werte. Damit erhält man den ΔC_T -Wert, der angibt, wie viele RNA Moleküle des untersuchten RNA-Abschnitts pro RNA-Molekül des Haushaltsgens vorhanden waren. Somit werden Artefakte aufgrund unterschiedlich eingesetzter RNA-Mengen und variierender Qualität der RNA minimiert. Anschließend werden die Unterschiede zwischen in den ΔC_T -Werten zwischen den Genen von Interesse und dem Referenzgen berechnet, der $\Delta\Delta C_T$ -Wert. Die Veränderung in der Expression des Gens von Interesse zu dem Referenzgen entspricht dann $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$.

4.2.6. Molekularbiologische Untersuchung des Immunglobulin-Repertoires humaner Plasmazellen mittels Einzelzell-Reverse Transkription-PCR

Die Einzelzell-Analyse stellt eine effiziente Methode dar, um Informationen nicht nur über eine gesamte Zellpopulation zu erhalten, sondern auf dem Level einer individuellen Zelle, welche anschließend wieder auf Populationslevel erweitert werden kann, abhängig von der Anzahl analysierter Zellen.

Zur Untersuchung humaner PZ, welche in den isolierten mononukleären Zellen der Magenmukosa enthalten waren, wurden diese mittels FACS in Einzelzellen sortiert. Nach Aufschluss dieser Einzelzellen und Reversen Transkription der mRNA in cDNA wurde mittels einer *nested* (geschachtelte) PCR, d.h. eine Zwei-Schritt PCR, die Expression der Ig-Ketten Gene (IgH, Igλ oder Igκ Gene) untersucht. Das korrekte PCR Produkt (entsprechend der Größe) wurde anschließend aus einem Agarosegel isoliert und sequenziert. Der Prozess ist in Abbildung 4-3 dargestellt. Anhand der Sequenz wurden neben der V_H -, D-, und J_H -Nutzung, die CDRH3-Länge sowie eingefügte Mutationen analysiert.

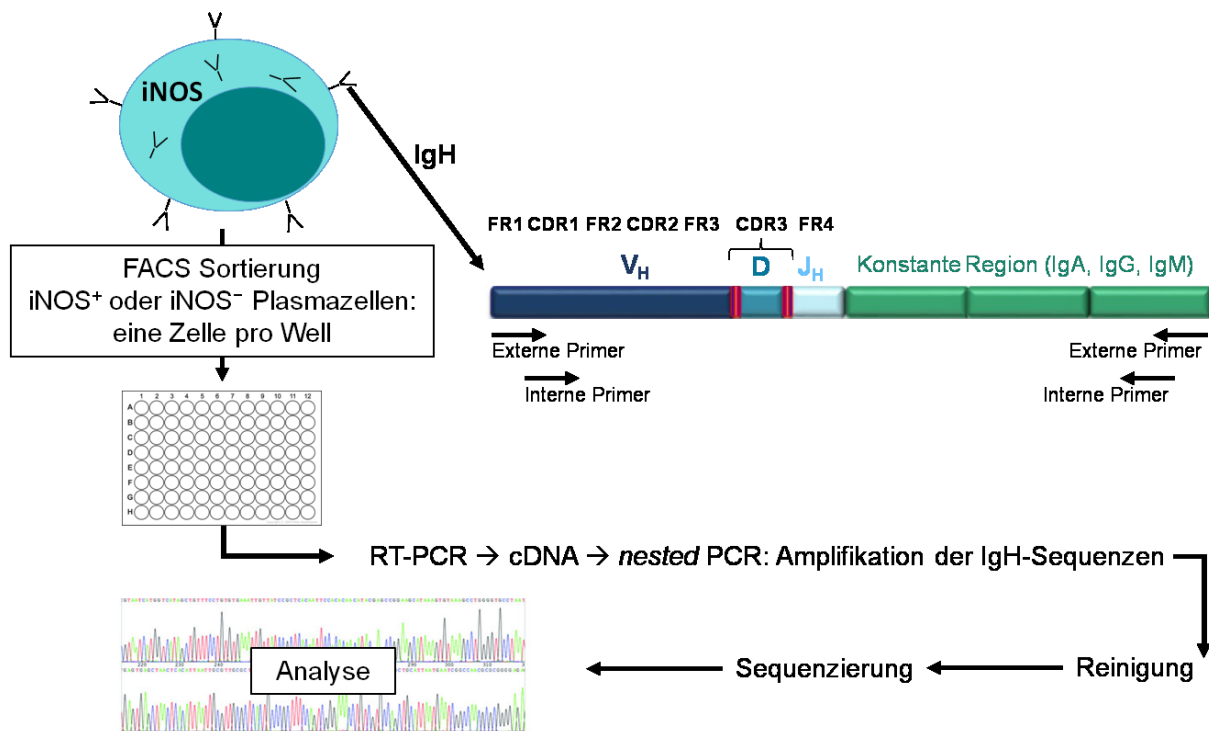


Abbildung 4-3 Schematische Darstellung der iNOS⁺ bzw. iNOS⁻ Plasmazell-Isolierung mittels FACS und der Einzelzell-PCR Methode für die Amplifizierung der spezifischen IgH-Kette

Die Vervielfältigung der IgH Sequenz von iNOS⁻ bzw. iNOS⁺ Plasmazellen wurde mittels RT-PCR der mRNA einzelner isolierter Zellen erreicht, gefolgt von einer *nested* PCR. Die externen Vorwärts-Primer sind in der Leader-Sequenz der mRNA lokalisiert. Sechs V_H-Familien spezifische Vorwärts-Primer wurden sowohl in der externen als auch internen PCR benutzt, um Segmente aller V_H-Familien zu vervielfältigen. Für die konstante Antikörperregion (Rückwärts-Primer) wurde für jeden Haupt-Isotyp (IgA, IgG oder IgM) ein individueller Primer benutzt.

4.2.6.1. Einzelzell-FACS Sortierung, RNA-Extraktion und cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Vor der Zellsortierung wurden 30 µl eines Master-Mix in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte, in die die PZ einzeln sortiert werden sollten, vorgelegt. Der Master-Mix enthielt je Vertiefung 8,3 mM DTT, 0,5 µg BSA, 1,7 % TritonX-100, 0,8 nM Spermidin, 0,4 ng p(dT)₁₅ Primer und 20 U RNasin Plus RNase Inhibitor in Wasser. Direkt vor der Zellsortierung wurde 1 µl des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI zu den gefärbten Zellen zugegeben, um tote Zellen auszuschließen. Anschließend wurden mit dem Zellsortiergerät FACSaria lebende iNOS⁺ bzw. iNOS⁻ PZ, welche als CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺CD3⁻CD14⁻CD20⁻DAPI⁻DAF-FM⁺ bzw. DAF-FM⁻ definiert wurden, in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte sortiert.

Durch das im vorgelegten Master-Mix enthaltene TritonX wurden die sortierten PZ sofort lysiert und ihre RNA freigesetzt. Der Abbau der instabilen RNA wurde durch RNasin, einen RNase-Inhibitor, verhindert. Spermidin, BSA und DTT dienten optimalen Bedingungen. Die ebenfalls im vorgelegten Master-Mix enthaltenen Primer lagerten sich an das PolyA-Ende der freigesetzten mRNA an und ermöglichten dadurch die spätere Umschreibung in cDNA. Dazu wurden 20 µl eines zweiten Mastermixes hinzugegeben, der den Titan One Tube kit RT-PCR Puffer (10 µL) und 1 µL AMV Reverse Transkriptase und 0,5 mM dNTPs enthielt, und die Platte anschließend mit Kappenstreifen verschlossen. Die Umschreibung der mRNA in stabilere cDNA erfolgte bei einer 60-minütigen Inkubation bei 50°C.

4.2.6.2. *Nested* PCR zur Amplifizierung schwerer und leichter Immunglobulinketten

Zur Untersuchung der exprimierten schweren Ig-Ketten (rearrangierte $V_HDJ_HC\gamma/\alpha/\mu$ Sequenzen) musste die durch Reverse Transkription entstandene cDNA stark vervielfacht werden, da sie nur in sehr geringen Mengen vorlag. Dazu wurde eine *nested* PCR verwendet. Bei der *nested* PCR handelt es sich um zwei aufeinander folgende konventionelle PCRs, bei denen selektiv ein DNA-Abschnitt (Amplikon) mittels spezifisch bindender Primer in mehreren Zyklen annähernd exponentiell vervielfältigt wird. Die beiden aufeinander folgenden PCRs sind dadurch geschachtelt, dass die in der ersten, sogenannten externen PCR entstandenen Produkte als Zielsequenz für eine zweite, interne PCR eingesetzt werden. Dadurch wird eine höhere Selektivität und Sensitivität als bei nur einer konventionellen PCR erreicht.

Für beide, externe und interne, PCRs wurde ein Reaktionsmix bestehend aus dem AmpliTaq DNA Polymerase Kit Komponenten, vorbereitet nach Herstellerangaben, vervollständigt mit 0,2 mM dNTPs und 0,07 μ M von jeden der externen bzw. internen Primer (Tab. 4-22, Tab. 4-23, Tab. 4-24). 5 μ l des externen PCR Produkts wurde als Vorlage für die interne PCR eingesetzt. Tabellen 4-22, 4-23- und 4-24 zeigen Beispiele für die Zusammensetzung eines Mixes für eine externe und interne PCR, die alle Vorwärtsprimer sowie Rückwärtsprimer für eine vollständige Repertoire-Analyse enthalten. Die externe PCR beinhaltete 7 min bei 95°C, 1 min bei 50°C, 90 sek bei 72°C, gefolgt von 50 Zyklen von 1 min bei 94°C, 30 sek bei 50°C, 90 sek bei 72°C und schließlich 1 min bei 94°C, 30 sek bei 50°C, 10 min 72°C.

Die Durchführung der internen PCR unterschied sich nur geringfügig von der externen PCR. Als Zielsequenz wurde anstatt cDNA 5 μ l des Produkts der externen PCR eingesetzt. Für die interne PCR wurde dasselbe Zyklusprogramm mit der Ausnahme der Temperatur des Primer-*Annealings*. Um die Spezifität der Bindung der Primer zu erhöhen, wurde die *Annealing*-Temperatur entsprechend auf 58°C erhöht.

Tabelle 4-22 Beispiel für Reaktionsmixe von externer und interner PCR mit allen Vorwärts- und Rückwärtsprimern der schweren Kette

Externer PCR-Mix	Volumen/Well	Interner PCR-Mix	Volumen/Well
ddH ₂ O	56,4 μ L	ddH ₂ O	56,4 μ L
10x PCR Puffer II	8 μ L	10x PCR Puffer II	8 μ L
MgCl ₂	8 μ L	MgCl ₂	8 μ L
dNTP Mix (je 10 mM)	1,6 μ L	dNTP Mix (je 10 mM)	1,6 μ L
Amplitaq DNA Polymerase	0,5 μ L	Amplitaq DNA Polymerase	0,5 μ L
VH1 LC	0,056 μ L	VH1 FM	0,056 μ L
VH2 LC	0,056 μ L	VH2 FM	0,056 μ L
VH3 LC	0,056 μ L	VH3 FM	0,056 μ L
VH4 LC	0,056 μ L	VH4 FM	0,056 μ L
VH5 LC	0,056 μ L	VH5 FM	0,056 μ L
VH6 LC	0,056 μ L	VH6 FM	0,056 μ L
IgA : IgVH- α	0,056 μ L	IgA: IgAex2	0,056 μ L
IgG: Ec γ *	0,056 μ L	IgG: IgGex*	0,056 μ L
IgM: Ec μ	0,056 μ L	IgM: IgMin,neu	0,056 μ L

Tabelle 4-23 Beispiel für Reaktionsmixe von externer und interner PCR mit allen Vorwärts- und Rückwärtsprimern der leichten Kette kappa

Externer PCR-Mix	Volumen/Well	Interner PCR-Mix	Volumen/Well
ddH ₂ O	56,4 µL	ddH ₂ O	56,4 µL
10x PCR Puffer II	8 µL	10x PCR Puffer II	8 µL
MgCl ₂	8 µL	MgCl ₂	8 µL
dNTP Mix (je 10 mM)	1,6 µL	dNTP Mix (je 10 mM)	1,6 µL
Amplitaq DNA Polymerase	0,5 µL	Amplitaq DNA Polymerase	0,5 µL
5' L Vκ1/2	0,087 µL	5' Pan Vκ	0,26 µL
5' L Vκ1/2	0,087 µL	3' BsiWI Jκ 1/4	0,065 µL
5' L Vκ1/2	0,087 µL	3' BsiWI Jκ 2	0,065 µL
3' Cκ543	0,26 µL	3' BsiWI Jκ 3	0,065 µL
		3' BsiWI Jκ 5	0,065 µL

Tabelle 4-24 Beispiel für Reaktionsmixe von externer und interner PCR mit allen Vorwärts- und Rückwärtsprimern der leichten Kette lambda

Externer PCR-Mix	Volumen/Well	Interner PCR-Mix	Volumen/Well
ddH ₂ O	56,4 µL	ddH ₂ O	56,4 µL
10x PCR Puffer II	8 µL	10x PCR Puffer II	8 µL
MgCl ₂	8 µL	MgCl ₂	8 µL
dNTP Mix (je 10 mM)	1,6 µL	dNTP Mix (je 10 mM)	1,6 µL
Amplitaq DNA Polymerase	0,5 µL	Amplitaq DNA Polymerase	0,5 µL
5' L Vλ1	0,037 µL	5' AgeI Vλ1	0,043 µL
5' L Vλ2	0,037 µL	5' AgeI Vλ2	0,043 µL
5' L Vλ3	0,037 µL	5' AgeI Vλ3	0,043 µL
5' L Vλ4/5	0,037 µL	5' AgeI Vλ4/5	0,043 µL
5' L Vλ6	0,037 µL	5' AgeI Vλ6	0,043 µL
5' L Vλ7	0,037 µL	5' AgeI Vλ7/8	0,043 µL
5' L Vλ8	0,037 µL	3' XhoI Cλ	0,26 µL
3' Cλ	0,26 µL		

4.2.6.3. Reinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte

Um die detektierten PCR-Produkte sequenzieren zu können, mussten diese in reiner Form und hoher Konzentration vorliegen. Dazu wurden sie mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt, aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und anschließend aus dem Gel extrahiert.

25 µl bis 50 µl des PCR-Produktes wurden mit 20 µl tRoti-Load Ladepuffer gemischt und mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (1,8 % Agarose-Gel, gelöst in 0,5 % TBE-Puffer) getrennt. Zusätzlich wurde ein DNA-Größenmarker aufgetragen, der der Ermittlung der Längen der PCR-Produkte diente. Die DNA Fragmente wurden mittels GelRed durch Exposition von UV-Licht der Wellenlänge 312 nm sichtbar gemacht, ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit entsprechend der Herstellerangaben gereinigt. Dabei wurde in mehreren Schritten das ausgeschnittene Agarose-Gel, welches die PCR-Produkte enthielt, aufgelöst und entfernt. Die PCR-Produkte wurden reversibel an eine Säulenmembran gebunden, gewaschen sowie eluiert. Die Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon (Martinsried, Germany), die die ermittelten Sequenzen zur Verfügung stellte.

4.2.6.4. Sequenzanalysen

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe von der Software Chromas 2.33 sequence viewer (Chromas Technelysim, Helensvale, Australia) und der Software JOINSOLVER® (<http://joinsolver.niams.nih.gov>) unter Benutzung der Kabat-Datenbank (186) analysiert. Dabei wurden die Ig-Isotypen und -Subklassen sowie die V(D)J-Rekombinationen, die CDRH3-Längen, die Mutationsfrequenzen und die R/S-Verhältnisse bestimmt. Die Ig-Isotypen und -Subklassen sowie die V(D)J-Rekombinationen wurden dabei anhand eines Vergleichs der zu untersuchenden Sequenz mit den in der Datenbank nach Kabat enthaltenen Keimbahngenen ermittelt. Somatische Hypermutationen (SHM) wurden innerhalb der VH-Gene zwischen FWR1 und FWR3 gezählt, diese enthalten IgH-Ketten CDR1 (CDRH1) sowie CDRH2, aber schließt die CDRH3 Region aus. Bei den R/S-Verhältnissen handelt es sich um das Verhältnis von Austausch-Mutationen (Replacement, R) zu stillen (Silent, S) Mutationen.

4.2.7. Herstellung monoklonarer rekombinanter Antikörper aus einzelnen humanen Plasmazellen

Ausgehend von der molekularbiologischen Untersuchung des Ig-Repertoires wurde eine Strategie entwickelt die Antikörper einzelner humaner BZ oder PZ definierten Ursprungs zu klonieren und exprimieren (187). Die rekombinanten Antikörper können anschließend in verschiedenen Verfahren getestet werden.

4.2.7.1. Einfügen von Restriktionsschnittstellen mittels PCR

Die spezifischen internen PCR-Primer ermöglichen neben der Amplifikation von DNA-Fragmenten außerdem das Anfügen von kurzen Sequenzabschnitten sowohl an das 5'- als auch an das 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Stücks. Auf diese Weise konnten gezielt zusätzliche Restriktionsschnittstellen für Klonierungen angefügt werden.

Für die spezifischen internen PCRs wurde für jede schwere Kette und für die beiden leichten Ketten ein Reaktionsmix bestehend aus dem AmpliTaq DNA Polymerase Kit Komponenten, vorbereitet nach Herstellerangaben, 0,2 mM dNTPs und den spezifischen internen Primern, je einen V-Segment-spezifischen Vorwärtsprimer sowie einen J-Segment-spezifischen Rückwärtsprimer, hergestellt (Tab. 4-25). 5 µl des externen PCR Produkts (s. 4.2.6.2. *Nested* PCR zur Amplifizierung schwerer und leichter Ig-Ketten) wurde als Vorlage für die interne PCR eingesetzt. Tabelle 4-25 zeigt die Zusammensetzung eines Mixes für eine spezifische interne PCR. Die spezifische interne PCR beinhaltete 7 min bei 95°C, 1 min bei 50°C, 90 sek bei 72°C, gefolgt von 50 Zyklen von 1 min bei 94°C, 30 sek bei 58°C, 90 sek bei 72°C und schließlich 1 min bei 94°C, 30 sek bei 50°C, 10 min 72°C.

Tabelle 4-25 Reaktionsmix von einer spezifischen internen PCR

Interner PCR-Mix	Volumen pro Well
ddH ₂ O	56,9 µL
10x PCR Puffer II	8 µL
MgCl ₂	8 µL
dNTP Mix (je 10 mM)	1,6 µL
Amplitaq DNA Polymerase	0,5 µL
Vorwärtsprimer (5 µM)	1 µL
Rückwärtsprimer (5µM)	1 µL

Nach Abschluss der PCR wurde der Ansatz bei 4°C aufbewahrt. Ein Aliquot wurde elektrophoretisch aufgetrennt (s. 4.2.6.3. Reinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte), um die Amplifikation zu überprüfen. Sollte das Produkt noch weiter verwendet werden, da erfolgreich schwere und leichte Kette einer cDNA amplifiziert werden konnten, wurde es mittels QIAquick® PCR Purification Kit laut Herstellerangaben gereinigt und in 50 µl eluiert.

4.2.7.2. Restriktionsansätze

Die Restriktion von DNA (PCR-Produkte oder Vektoren) durch spezifische Endonukleasen erfolgte in Ansätzen mit 30 µl Gesamtvolumen unter den von der Bezugsfirma (NEB) empfohlenen Bedingungen (Puffer, Temperatur). Die eingesetzte Enzymmenge richtete sich nach der DNA-Konzentration im Restriktionsansatz; das Volumen der zugesetzten Enzymlösung betrug dabei nie mehr als ein Zehntel des Gesamtvolumens. Ansätze mit zwei oder mehr Enzymen wurden verwendet, sofern die Aktivität für die beiden Enzyme unter den gewählten Bedingungen noch zu mindestens 70 % gewährleistet war. Anderenfalls erfolgte die Behandlung mit den Restriktionsenzymen nacheinander (Tab. 4-26). Die Inkubationsdauer für Restriktionen lag in der Regel bei drei Stunden, bei zwei aufeinanderfolgenden Verdauungsansätzen je 1,5 h. Zur Spaltung von 1 µg DNA wurden ca. 10 U Enzym eingesetzt. Anschließend erfolgte eine Hitze-Inaktivierung der Enzyme durch eine 20-minütige Inkubation bei 65°C. Für die Reinigung des verdauten Produktes wurde es nach einer präparativen Elektrophorese, mittels peqGOLD® Gel Extraction Kit laut Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert und mit 40-60 µl eluiert. DNA-Konzentrationen wurden photometrisch am NanoDrop®, durch Messung der Absorption bei 260 nm gegen Ultrapureinstwasser bestimmt, wobei 1 OD₂₆₀ 50 ng/µl doppelsträngiger DNA entsprechen.

Tabelle 4-26 Ansätze für DNA-Verdau mit spezifischen Restriktionsenzymen

Mix schwere Kette	Volumen pro Ansatz	Mix λ Kette	Volumen pro Ansatz
ddH ₂ O	0 µL	ddH ₂ O	0 µL
Cutsmart 10x	3 µL	Cutsmart 10x	3 µL
AgeI-HF	1 µL	AgeI-HF	1 µL
SallI-HF	1 µL	XhoI	1 µL
DNA	25 µl	DNA	25 µl
Mix 1 κ Kette	Volumen pro Ansatz	Mix 2 κ Kette	Volumen pro Ansatz
ddH ₂ O	0 µL	ddH ₂ O	7 µL
Cutsmart 10x	3 µL	NEB 3.1.10x	3 µL
AgeI-HF	1 µL	BsiWI	1 µL
DNA	25 µl	Mix 1 κ Kette	29 µl

4.2.7.3. Ligation von DNA-Fragmenten

In der Regel wurden die zu ligierenden DNA-Fragmente in einem Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Die Ligationsansätze enthielten in einem Volumen von 20 µl 2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer, die zu ligierenden DNA-Fragmente in ddH₂O sowie 400 U T4-DNA-Ligase (400 U/µl). Die Ligation erfolgte für 1-2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die T4-DNA-Ligase durch eine 10-minütige Inkubation bei 65°C hitzeinaktiviert. Die PCR-Produkte wurden in human Iγ1, Iγκ and Iγλ Expressionsvektoren kloniert, die eine murine Ig Gen-

Signalpeptidsequenz (GenBank accession no. DQ407610) und eine multiple Klonierungsstelle stromaufwärts der humanen Ig γ 1, Ig κ oder Ig λ konstanten Regionen enthält. Die Transkription ist unter Kontrolle des humanen Cytomegalovirus (HCMV) Promotor und Klone können mittels Ampicillin-Resistenz selektiert werden.

4.2.7.4. Transformation

Die Transformation von Plasmid-DNA sowie ligierter Plasmid-DNA nach Klonierungen wurde nach der Hitzeschock-Methode durchgeführt (188). Für Transformationen wurden kompetente Bakterien des Stammes *E. coli* TOP10 verwendet, die bei -80°C gelagert wurden. Für eine Transformation wurde pro Ansatz ein 20 μ l Aliquot chemisch kompetenter Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Die Menge der zu transformierenden DNA variierte bei Plasmid-DNA zwischen 20-40 ng und bei Ligationen zwischen 1-2 μ l des entsprechenden Ligationsansatzes. Die Zellen wurden mit der zu transformierenden DNA versetzt und anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dem nachfolgenden Hitzeschock von 90 sek bei 42°C folgte eine zweiminütige Inkubation der Zellen auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen mit 250 μ l auf 37°C erwärmtem SOC-Medium versetzt und 60 min bei 37°C geschüttelt (220 rpm), so dass die über das eingebrachte Plasmid vermittelte Resistenz ausgebildet werden konnte. Anschließend wurden 100 μ l die auf LB-Nährboden-Platten mit Selektionsantibiotikum (Ampicillin) und zur Kontrolle 20 μ l auf LB-Platten ohne Selektionsmedium ausplattiert und etwa 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

Zur Kontrolle ob die Bakterienkolonien auch Plasmide mit einem Insert enthalten, wurden einige Kolonien mittels PCR getestet und neu ausgestrichen. Die PCR erfolgte mit dem 5' Absense als Vorwärtsprimer und 3'IgG internal, 3'C κ 494 oder 3'C λ als Rückwärtsprimer. Die Tabelle 4-27 zeigt die Zusammensetzung eines Mixes für eine Kontroll-PCR.

Die Kontroll-PCR beinhaltete 5 min bei 94°C, gefolgt von 27 Zyklen von 30 sek bei 94°C, 30 sek bei 58°C, 60 sek bei 72°C und schließlich 10 min 72°C.

Anschließend wurde ein 5 μ l-Aliquot elektrophoretisch aufgetrennt (s. 4.2.6.3. Reinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte).

Tabelle 4-27 Reaktionsmix der Kontroll-PCR

Kontroll-PCR-Mix	Volumen pro Well
ddH ₂ O	21,67 μ L
10x PCR Puffer II	2,5 μ L
dNTP Mix (je 10 mM)	0,5 μ L
Amplitaq DNA Polymerase	0,16 μ L
5' Absense	0,085 μ L
Rückwärtsprimer	0,085 μ L
IgH: 3'IgG internal oder	
Ig κ : 3'C κ 494 oder	
Ig λ : 3'C λ	

Bei erfolgreich eingefügten PCR-Produkten (650 bp für Ig γ 1, 700 bp für Ig κ und 590 bp für Ig λ), wurden die restlichen 20 μ l PCR-Produkt mittels QIAquick® PCR Purification Kit laut Herstellerangaben gereinigt und in 30 μ l eluiert. Anschließend wurden die aufgereinigten PCR-Produkte zur Sequenzierung an die Firma Eurofins MWG Operon geschickt, um die Identität mit dem ursprünglichen PCR Produkt zu bestätigen.

4.2.7.5. Isolierung von Plasmid-DNA

Bei erfolgreicher Klonierung und 100 % Übereinstimmung der ursprünglichen Sequenz mit der Sequenz nach Klonierung in den jeweiligen Expressionsvektor sollten die Plasmide angereichert werden. Hierzu wurden die entsprechenden *E. coli*-Einzelkolonien als Flüssigkulturen in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 12 ml LB-Medium mit Ampicillin (75 µg/ml) bei 37°C und 220 rpm ü.N. auf Rotationsschüttlern angezogen. Die hochreine Plasmid-DNA (bis zu 50 µg) wurde aus dreimal 2 ml *E. coli*-Kultur mit dem peqGOLD® Plasmid Miniprep I Kit nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Das Prinzip beruht auf alkalischer Lyse der Zellen mit nachfolgender Adsorption der Nukleinsäuren an eine Silicagelmatrix in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Nach Waschschritten konnte die DNA in konzentrierter Form mit Tris-HCl-Puffer (zweimal 35 µl) eluiert und direkt für weitere Klonierungsschritte oder eine Transfektion verwendet werden. DNA-Konzentrationen wurden photometrisch am NanoDrop®, durch Messung der Absorption bei 260 nm gegen Ultrareinstwasser bestimmt. Aus 6 ml Bakterienkultur konnten durchschnittlich 14 µg Plasmid-DNA gewonnen werden nach Elution mit zweimal 35 µl Elutionspuffer.

4.2.7.6. Transfektion eukaryotischer Zellen zur Antikörpergewinnung

Das Prinzip der Transfektion beruht auf dem Transfer von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen, wobei ein Polykation verwendet wird, um polyanionische DNA zu komplexieren. Als Transfektionsreagenz wurde SuperFect Transfection Reagent® nach Anweisungen des Herstellers eingesetzt. Dieses Transfektionsreagenz beruht auf der aktivierten Dendrimer-Technologie, wobei die DNA in kompakte Strukturen verpackt wird. Die Komplexe werden dem Kulturmedium zugegeben, adsorbieren an die Zelloberfläche und werden durch unspezifische Endozytose in die Zelle aufgenommen. Da die Lebensdauer der aufgenommenen Plasmid-DNA nur auf wenige Tage beschränkt ist, spricht man von einer transienten Transfektion.

Die zu transfizierenden HEK-293T Zellen wurden einen Tag zuvor in eine T25-Kulturflasche ausgesät (1×10^6 Zellen in 5 ml HEK-Medium mit 7 % Ultra-low IgG FCS), so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70-80 % aufwiesen. Je Transfektion wurden je 2,5 µg DNA beider Vektoren (schwere und leichte Kette) gemischt und auf 150 µl mit HEK-Medium (ohne Antibiotikum, ohne FCS) aufgefüllt und 25 µl Superfect Transfection Reagent® zugegeben. und 10 min bei RT inkubiert. Dieser Ansatz wurde vorsichtig gevortext und 10 min bei RT stengelassen. In dieser Zeit wurden die HEK-Zellen mit 4 ml PBS gewaschen. Nach der Inkubation wurde 1 ml HEK-Medium mit 10 % Ultra-low IgG FCS zu den Komplexen gegeben gemischt und auf die HEK-293T Zellen gegeben. Die Zellen kamen für ca. 2,5 h in einen Inkubator mit 37°C und Begasung mit 5 % CO₂, dann wurden die Komplexe abgenommen, mit 4 ml Medium (ohne FCS) gewaschen und 3 ml Medium mit 4 % Ultra-low IgG FCS zugegeben und die Zellen unter normalen Bedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurden 3 ml Medium (ohne FCS) in eine T75-Kulturflasche überführt und weitere 15 ml HEK-Medium (2 % Ultra-low IgG FCS) zugegeben und für die Synthese der rekombinanten Proteine weitere sechs Tage kultiviert.

4.2.7.7. Reinigung Rekombinanter Antikörper

Zur Gewinnung der Antikörper wurden die Zellkultur-Überstände abgenommen und bei 650xg für 10 min zentrifugiert um Zellrückstände zu entfernen. Anschließend wurde den Überständen 0,05 % Natrium-Azid zugegeben um Zellwachstum zu verhindern und bei 4°C gelagert. Rekombinante Antikörper wurden mittels Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow gereinigt. Hierzu wurde zunächst je Ansatz 25 µl Sepharose in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, bei 370xg 2 min zentrifugiert um den Ethanol vorsichtig abzunehmen. Die Sepharose wurde anschließend dreimal mit je 1 ml DMEM-Medium gewaschen. Schließlich wurde die Sepharose 1:1 mit Medium gemischt und auf die Kulturüberstände verteilt. Etwa 20 ml Zellkulturüberstände wurden mit 25 µl Protein G Sepharose bei 4°C für mindestens 16 h rotierend inkubiert. Überstände wurden nach 10-minütiger Zentrifugation bei 650xg abgenommen und die Sepharose mittels 2 ml PBS in Chromatographie-Zentrifugationssäulen überführt, die mit PBS äquilibriert wurden. Nach zweimaligen Waschen mit 1 ml PBS wurden die Antikörper in 4-6 Fraktionen á 200 µl mit 0,1 M Glycin (pH 3) eluiert. Die Eluate wurden in Reaktionsgefäßen gesammelt die bereits 20 µl 1 M Tris (pH 8,5) mit 0,5 % Natriumazetat enthielten.

4.2.7.8. Denaturierende Protein-Gelelektrophorese

Die denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen wurde im Puffersystem von Laemmli nach Standardmethoden durchgeführt (189). Sie diente der Qualitätskontrolle und Überprüfung der Funktionalität der rekombinanten monoklonalen humanen Antikörpern. Proteinlösungen wurden mit 0,2 Vol. Proteinladepuffer gemischt, für 10 min bei 95 °C denaturiert und auf Standard-SDS-Polyacrylamidgelen (5 % Sammel-, 12 % Trenngel) parallel zu 10 µl eines Größen- bzw. Mengenstandards (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa) in 1x SDS-Laufpuffer aufgetrennt. Es wurden vertikale Elektrophoresesysteme verwendet (Spannung: 150 V).

Zum Anfärben der Proteine im Gel wurde anschließend eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Dafür wird das Gel in einer Coomassie Blue R250-Färbelösung (0,05 % (w/v) Coomassie R250-haltigen 10 % (v/v) Essigsäure in 50 % (v/v) Ethanol) für ca. 2-3 Stunden inkubiert. Anschließend wird die überschüssige Farbe mittels Entfärberlösung (5 % (v/v) Methanol mit 12,5 % (v/v) Essigsäure) entfernt. Hierbei wird das Gel unter regelmäßigem Austausch der Entfärberlösung solange inkubiert, bis die Hintergrundfarbe annähernd verschwunden ist.

Unter den reduzierenden Bedingungen und durch die Auftrennung im Gel ist es möglich, die beiden Untereinheiten, leichte (ca. 25 kDa) und schwere (ca. 50 kDa) Ig-Kette zu detektieren. Es wurden etwa 0,75 µg Protein je Probe und als Kontrolle 0,75 µg humanes Serum IgG aufgetragen.

4.2.8. Charakterisierung der rekombinanten Antikörper mittels ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)

Das Prinzip eines ELISA basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die durch einen Spezies-spezifischen Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper quantifiziert werden kann. Der ELISA ermöglicht zusätzlich zur spezifischen Detektion die Titerbestimmung der Antikörper sowie die Bestimmung der Avidität monoklonaler Antikörper.

4.2.8.1. ELISA für Konzentrationsbestimmung der Antikörper

Die Konzentrationen der gereinigten rekombinanten Antikörper wurden mittels ELISA und einer Standardreihe von humanem Serum-IgG1 (verdünnt in PBS, 0-5 µg/ml) bestimmt. ELISA-Platten wurden mit 50 µl anti-human IgG-Antikörpern mit einer Konzentration von 2 µg/ml in PBS über Nacht bei 4°C beschichtet.

Die Platten wurden dreimal mit 200 µl VE-Wasser pro Vertiefung gewaschen, bevor sie für 1 h mit 200 µl 2 mM EDTA und 0,05 % Tween20 in PBS inkubiert wurden. Nach erneutem einmaligem Waschen mit Wasser wurden jeweils 50 µl des Standards und der Proben in die ELISA-Platten überführt und für 2 h inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit Wasser entfernt, bevor die Platten 50 µl anti-human IgG-Peroxidase-Antikörpern mit einer Konzentration von 0,8 µg/ml in PBS, 2 mM EDTA, 0,05 % Tween20 für 2 h inkubiert wurden. Nach einmaligem Waschen wurden die Platten mit 200 µl PBS, 2 mM EDTA, 0,05 % Tween20 für 1 h inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die ELISA-Platten mit TMB-Substrat laut Herstellerangaben entwickelt. Die Optische Dichte wurde bei 620 nm oder nach Abstoppen mit 2 N H₂SO₄ bei 450 nm gemessen. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Alle Ansätze wurden in Duplikaten gemessen. Mittelwerte der Duplikate wurden mit dem Tabellenkalkulations-Programm Microsoft Excel berechnet.

4.2.8.2. ELISA zur Bestimmung der Bindungseigenschaften der Antikörper

Zur Ermittlung der Polyreaktivität und der Spezifität der rekombinanten Antikörper für *H. pylori* Proteine wurden verschiedene ELISA-Analysen durchgeführt.

Die zu testenden Antikörper wurden auf eine Konzentration von 1 µg/ml bzw. 2 µg/ml mit PBS eingestellt. ELISAs wurden wie unter 4.2.8.1. beschrieben durchgeführt, außer dass die Platten mit 50 µl/Vertiefung mit einem individuellen Antigen beschichtet wurden. Die Antigene wurden in verschiedenen Konzentrationen verwendet: ca. 500 µg/ml *H. pylori*-Lysat, 500 µg/ml *H. pylori*-Lysat-Überstand, 10 µg/ml Lipopolysaccharide (LPS), doppelsträngige DNA (dsDNA) oder einzelsträngige DNA (ssDNA) in PBS.

ssDNA wurde aus dsDNA von Lachssperma durch Kochen bei 95°C für 30 min hergestellt und anschließend aliquotiert und sofort bei -20°C eingefroren. LPS von *E. coli* und *H. pylori*-Lysat, hergestellt mittels Ultraschall aus *Helicobacter pylori* P12 wt, wurden ebenfalls bei -20°C aufbewahrt.

Als Positiv- und Negativkontrolle, dienten Kontrollseren des kommerziellen RIDASCREEN® *Helicobacter* IgG ELISA.

4.2.9. Charakterisierung der rekombinanten Antikörper mittels Western-Blot-Analyse

Neben dem ELISA wurde auch die Western-Blot-Analyse zur Detektion von spezifischen Antikörpern genutzt. Der Nachweis basiert, wie beim ELISA, auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die durch einen Spezies-spezifischen Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper quantifiziert werden kann. Mithilfe des *recomLine Helicobacter* IgG Kits konnten die rekombinanten Antikörper auf die Bindespezifität definierter *H. pylori*-Proteine getestet werden, die auf Teststreifen transferiert wurden. Die zu testenden Antigene in dem Kit waren CagA, VacA, GroEL, UreA, HcpC und gGT. Die Teststreifen wurden in einem 15 ml-Reaktionsgefäß mit 1 ml Antikörperlösung (1,5 µg/ml Antikörper verdünnt in Probenpuffer)

über Nacht bei 4°C schwenkend inkubiert. Anschließend wurden die Streifen dreimal mit 2 ml Waschpuffer für je 5 min gewaschen. Danach wurden 2 ml der Sekundärantikörper-Lösung (1:100 verdünnt in Waschpuffer) für 50 min bei RT schwenkend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Streifen mit je 1,5 ml TBM-Lösung für 10 min entwickelt. Nach Abspülen mit Wasser konnten die Teststreifen ausgewertet und gelagert werden.

4.2.10. Statistik

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mittels der Software GraphPad Prism Version 5.0 und 6.0 (<http://www.graphpad.com>). Für die grafische Darstellung wurden Balken- und Einzelpunktdiagramme mit einer gruppenspezifischen Farbgestaltung gewählt. Alle in dieser Arbeit dargestellten Diagramme, die eine Ratio darstellen, wurden als Median mit Quartilsabständen abgebildet. Zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen wurden die meisten Daten dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test unterzogen. Bei einem Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der Friedman-Test mit anschließender DUNN's-*post-hoc* Analyse verwendet.

P Werte < 0.05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

5. ERGEBNISSE

5.1. Phänotypische Charakterisierung von B-Zellen und Plasmazellen im Kontext einer chronischen *H. pylori*-Infektion

In Voruntersuchungen konnte mittels Immunhistochemie in der Magenmukosa von *H. pylori*-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen bereits eine hohe Anzahl an PZ gefunden werden (169). Weiterhin konnte in der Magenmukosa *H. pylori*-infizierter Patienten immunhistochemisch eine Subpopulation von PZ identifiziert werden, welche iNOS exprimierten. Diese iNOS⁺ PZ-Population wurde in Kontrollen nicht detektiert. Dies ist, unseres Wissens, der erste Bericht über die iNOS-Expression in humanen PZ. Daher wurden die PZ und BZ von *H. pylori*-Patienten in dieser Arbeit weiter sowohl phänotypisch mittels Durchflusszytometrie als auch qPCR untersucht. Weiterhin wurde immunhistochemisch das Vorkommen der iNOS-exprimierenden PZ bei anderen gastrointestinalen Infektionen untersucht.

5.1.1. Verteilung von B-Zell-Subtypen im Blut und Gewebe

Ein Ergebnis vorheriger immunhistochemischer Untersuchungen war, dass sehr viele PZ in der Magenmukosa *H. pylori*-infizierter Patienten zu finden sind. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst die Verteilung von BZ mithilfe des BZ-spezifischen Oberflächenmoleküls CD19 durchflusszytometrisch im peripheren Blut und der Magenmukosa untersucht und mit *H. pylori*-negativen Kontrollen verglichen. Die *Gating*-Strategie von repräsentativen Beispielen der LPL- und PBMC-Analyse ist in Abbildung 5-1 dargestellt.

Die Untersuchung ergab eine relative Anreicherung CD19⁺ BZ ($P = 0,0002$) innerhalb der mukosalen Lymphozyten von *H. pylori*-Patienten (Median 20 %) im Vergleich zu Kontrollen (1,2 %) (Abb. 5-2). In Übereinstimmung mit früheren Studien (190) enthielten LPL von Kontrollpatienten nahezu keine CD19⁺ BZ.

Bezüglich der PBMC zeigte sich ein höherer Anteil ($P = 0,0296$) CD19⁺ BZ in den *H. pylori*-Patienten (11,4 %) verglichen mit den Kontrollen (7,1 %) (Abb. 5-1 und 5-2).

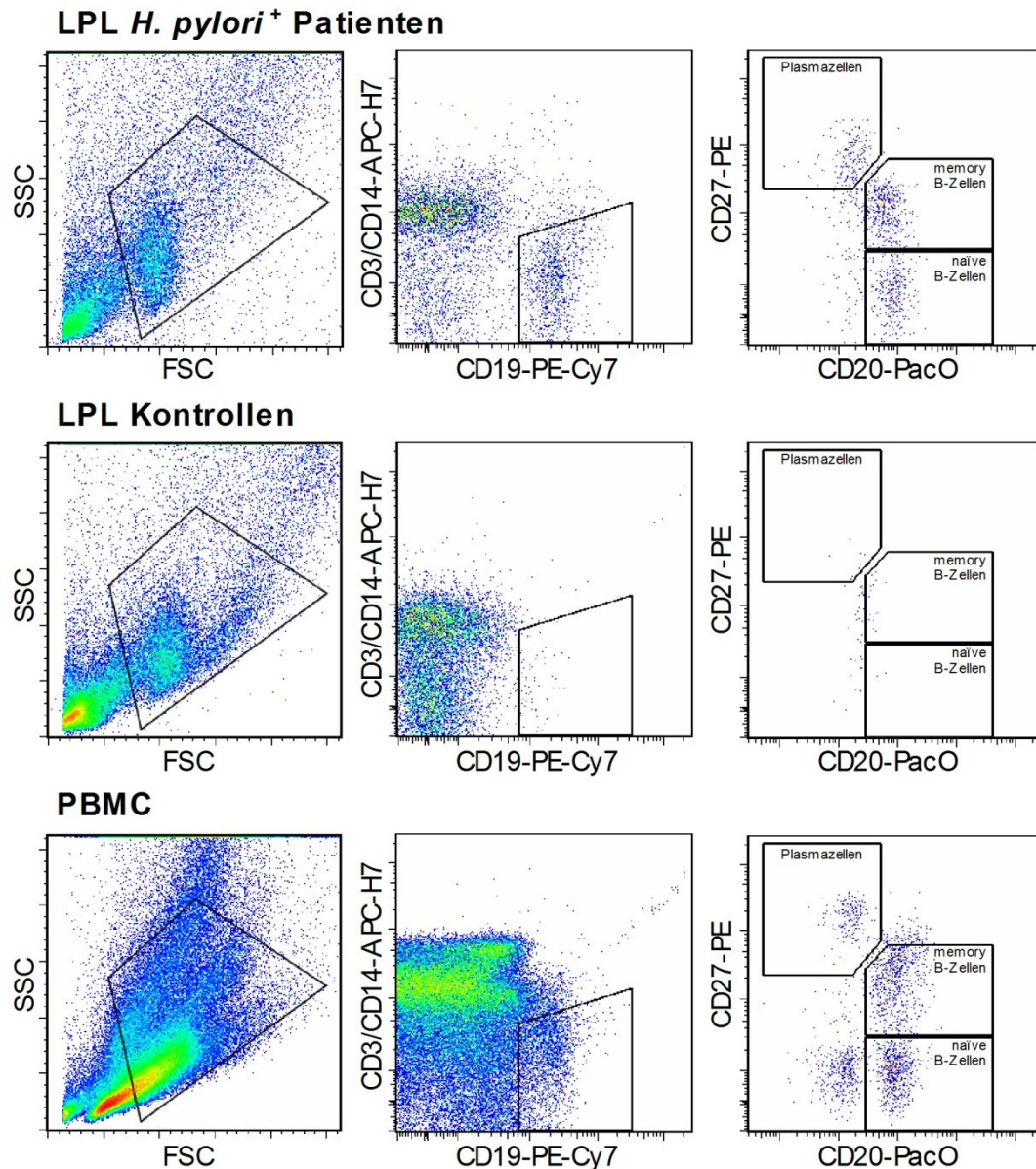


Abbildung 5-1 Repräsentative *Gating*-Strategie für die Analyse der LPL und PBMC hinsichtlich B-Zellsubtypen mittels Durchflusszytometrie

Links, *Gating* auf Lymphozyten durch Vorwärts- (FSC) und Seitwärts (SSC) Streuungseigenschaften; *Mitte*, Ausschluss von T-Zellen (CD3⁺) und Monozyten (CD14⁺) und *Gating* auf CD19⁺ B-Zellen; *Rechts*, Detektion von Plasmazellen (CD20⁻CD27⁺), memory B-Zellen (CD20⁺CD27⁺) und naiven B-Zellen (CD20⁺CD27⁻).

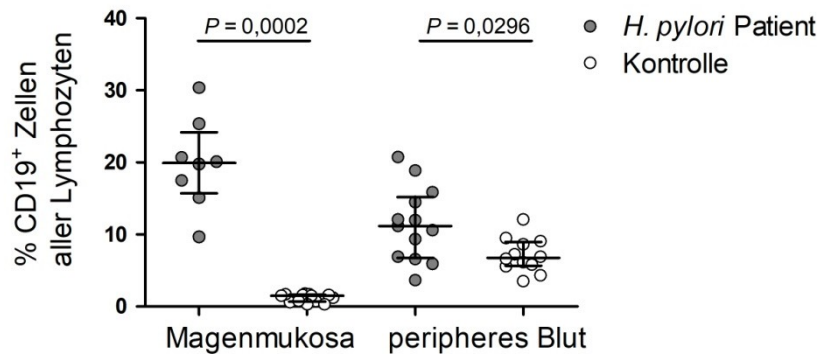


Abbildung 5-2 Verteilung CD19⁺ B-Zellen in der Magenmukosa und Blut von *H. pylori*-Patienten und Kontrollen.

Die aus der Magenmukosa bzw. peripherem Blut isolierten mononukleäre Zellen von *H. pylori*-Patienten und Kontrollen wurden auf die prozentuale Verteilung CD3⁺CD14⁺CD19⁺ B-Zellen aller Lymphozyten untersucht. Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt (Mann-Whitney Test).

Zusätzlich zu den Verteilungen CD19⁺ BZ wurden die prozentualen Anteile der verschiedenen BZ-Subtypen in der Magenmukosa und im peripheren Blut *H. pylori*-infizierter Patienten und Kontrollen bestimmt. Zur Differenzierung dieser Subtypen wurde die Klassifizierung der BZ durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD20 und CD27 genutzt. CD27 gilt als pan-mBZ-Marker, da er ermöglicht reaktive Antigen-erfahrene BZ von ausgereiften naiven BZ und Antikörper-sezernierenden PZ zu unterscheiden (191, 192). Demnach wurden die Anteile von PZ (CD19⁺CD20⁺CD27⁺), mBZ (CD19⁺CD20⁺CD27⁺) und naiven BZ (CD19⁺CD20⁺CD27⁻) an allen CD19⁺ BZ mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 5-1 und 5-3). Eine starke Anreicherung der PZ ($P = 0,0002$) konnte innerhalb der analysierten mukosalen CD19⁺ Lymphozyten von *H. pylori*-Patienten (Median 10,2 %) im Vergleich zu Kontrollen (0,4 %) gefunden werden. Ebenso zeigte sich im Blut ein höherer Anteil ($P = 0,0183$) an PZ in den *H. pylori*-Patienten (2,0 %) verglichen mit Kontrollen (0,9 %) (Abb. 5-3 links).

Zusätzlich zu den PZ waren auch die Anteile mukosaler memory und naiver BZ an allen CD19⁺ BZ signifikant erhöht ($P = 0,0225$ bzw. $P = 0,0013$) in *H. pylori*-Patienten (Median 38,9 % bzw. 22,9 %) verglichen mit nicht infizierten Kontrollen (7,5 % bzw. 2,2 %)(Abb. 5-3). Die peripheren mBZ unterschieden sich in ihrem Anteil an CD19⁺ BZ nicht zwischen *H. pylori*-infizierten Patienten (24,5 %) und Kontrollen (23,8 %). Die Anteile der peripheren naiven BZ an allen CD19⁺ BZ war in den Kontrollen (56,2 %) leicht erhöht ($P = 0,0402$) im Vergleich zu den *H. pylori*-Patienten (35,3 %)(Abb. 5-3 rechts).

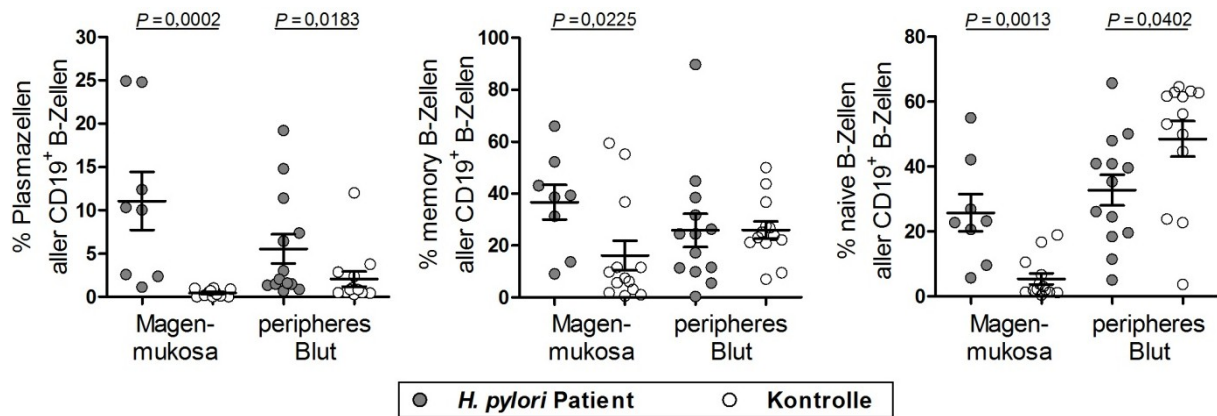


Abbildung 5-3 Verteilung CD19⁺ B-Zellsubtypen in der Magenmukosa und Blut von *H. pylori*-Patienten und Kontrollen

Die aus der Magenmukosa bzw. peripherem Blut isolierten mononukleäre Zellen von *H. pylori*-Patienten und Kontrollen wurden durchflusszytometrisch auf die prozentuale Verteilung von Plasmazellen (CD20⁻CD27⁺⁺), memory B-Zellen (CD20⁺CD27⁺) und naiven B-Zellen (CD20⁺CD27⁻) aller CD19⁺ B-Zellen untersucht. Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt (Mann-Whitney Test).

5.1.2. Analyse der Immunglobuline in der Magenmukosa und im Serum *H. pylori*-infizierter Patienten

Da die bisherigen Daten dieser Arbeit zeigten, dass in der Magenmukosa *H. pylori*-infizierter Patienten ein höherer Anteil der PZ an CD19⁺ BZ zu finden ist als in gesunden Kontrollen (Kap. 5.1.1), wurden zusätzlich die Antikörperkonzentrationen untersucht. Die Konzentrationen von IgM, IgA und Gesamt-IgG in Serumproben und Biopsieüberständen der Magenmukosa von *H. pylori*-Patienten (n = 8) und Kontrollen (n = 8) wurden mit Hilfe eines CBA bestimmt. Die Untersuchung ergab hinsichtlich der Konzentrationen der Ig im Serum keinen Unterschied zwischen *H. pylori*-Patienten und den Kontrollen (Abb. 5-4). Desweiteren entsprachen die Ig-Konzentrationen denen in der Literatur (193) angegebenen Werten. Die Analyse ergab IgM-Konzentrationen von 632 µg/ml für *H. pylori*-Patienten und 675 µg/ml für Kontrollen; diese lagen damit im normalen Bereich von 600-2500 µg/ml. Hinsichtlich der IgA-Konzentrationen wurden die Werte 1754 bzw. 2423 µg/ml ermittelt (normaler Bereich: 900-4500 µg/ml). Die IgG-Konzentrationen lagen mit 11805 bzw. 10927 µg/ml im normalen Bereich von 8000-18000 µg/ml. Die Analyse der Ig-Konzentrationen in den Biopsieüberständen der Magenmukosa ergab signifikant erhöhte ($P = 0,0148$) IgA-Konzentrationen der *H. pylori*-Patienten (Median 2,8 µg/ml) im Vergleich zu den Kontrollen (0,7 µg/ml) (Abb. 5-4). Mukosale IgM und IgG waren in sehr niedrigen Konzentrationen. Die IgM-Konzentrationen lagen bei 0,0 µg/ml für *H. pylori*-Patienten und 0,54 µg/ml für die

Kontrollen ($P = 0,0325$). Hinsichtlich der IgG-Konzentrationen verhielt es sich umgekehrt (*H. pylori*-Patienten: $0,77 \mu\text{g/ml}$, Kontrollen: $0,43 \mu\text{g/ml}$, $P = 0,0073$).

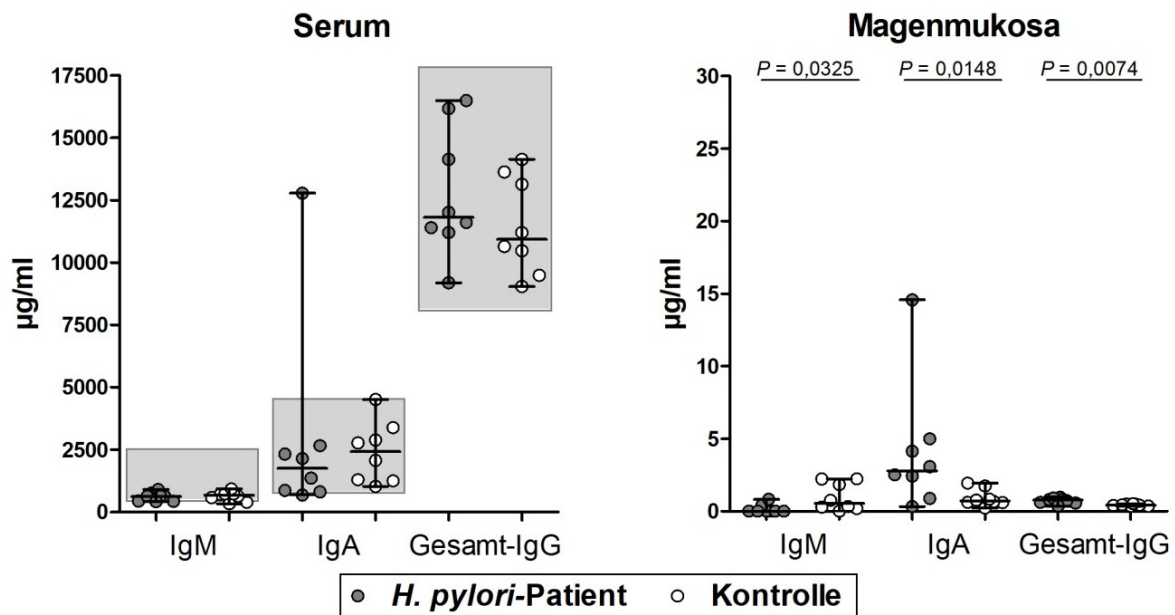


Abbildung 5-4 Konzentrationen von IgM, IgA und Gesamt-IgG im Serum und Biopsieüberständen der Magenmukosa *H. pylori*-infizierter Patienten und Kontrollen

Immunglobulin-Konzentrationen von IgM, IgA und Gesamt-IgG wurden in Serumproben (links) und in Biopsieüberständen der Magenmukosa (rechts) von *H. pylori*-Patienten ($n = 8$) und Kontrollen ($n = 8$) mit Hilfe eines CBA bestimmt. Normalbereiche der Ig-Konzentrationen im Serum sind grau dargestellt (193). Die Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt.

Insbesondere an mukosalen Oberflächen wie der Magenmukosa ist die Immunabwehr von Infektionen von der Produktion spezifischer Antikörper abhängig. Daher war die Analyse der Antikörper hinsichtlich ihrer *H. pylori*-Spezifität unerlässlich. Die Quantifizierung der IgG-Antikörper gegen *H. pylori* in Serumproben und Biopsieüberständen der Magenmukosa von *H. pylori*-Patienten ($n = 8$) und Kontrollen ($n = 8$) erfolgte mit Hilfe eines ELISAs (Abb. 5-5). Sowohl im Serum als auch in der Magenmukosa lagen signifikant erhöhte ($P = 0,0011$ bzw. $P = 0,0159$) Mengen an *H. pylori*-spezifischem IgG in den *H. pylori*-Patienten im Vergleich zu Kontrollen vor.

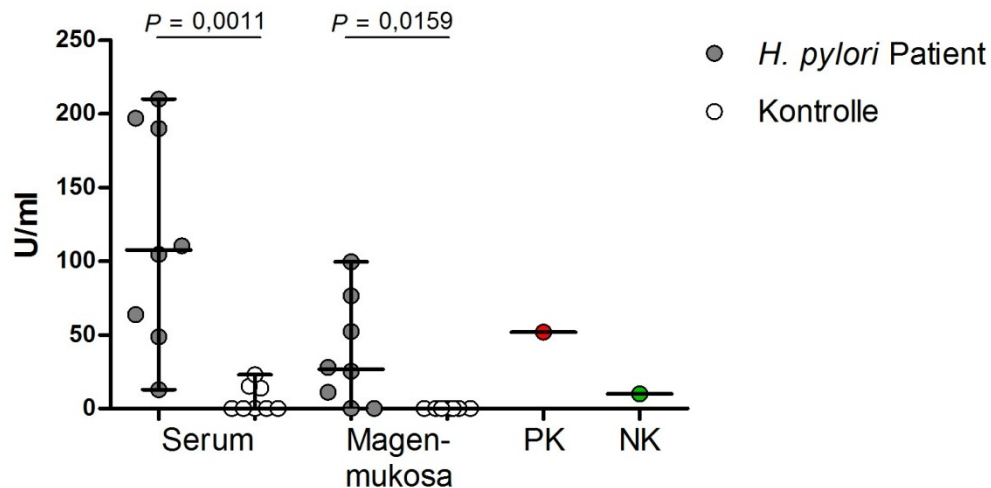


Abbildung 5-5 Nachweis *H. pylori*-spezifischer IgGs im humanen Serum und Biopsieüberständen der Magenmukosa von *H. pylori*-infizierten Patienten und Kontrollen

Quantifizierung der IgG-Antikörper gegen *H. pylori* in Serumproben und Biopsieüberständen der Magenmukosa von *H. pylori*-Patienten ($n = 8$) und Kontrollen ($n = 8$) mit Hilfe eines ELISAs. Als Positivkontrolle (PK) und Negativkontrolle (NK) dienten humane Seren, deren definierte Spezifität zur Quantifizierung genutzt wurden. Die Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt.

5.1.3. Starke Infiltrierung iNOS-exprimierender Plasmazellen in der Magenmukosa *H. pylori*-infizierter Patienten

Immunhistologische Voruntersuchungen zeigten in der Magenmukosa *H. pylori*-infizierter Patienten eine erhebliche Anzahl iNOS-exprimierender MUM1⁺ PZ, die bei gesunden Kontrollen nicht zu finden waren (170). Da iNOS⁺ PZ bisher noch nicht im Menschen beschrieben wurden, wurden die mukosalen PZ in dieser Arbeit genauer charakterisiert und zusätzlich mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer CD38-Expression, welche sie weiter von mBZ (CD38⁻) differenziert, und der intrazellulären iNOS-Expression untersucht (Abb. 5-6). Interessanterweise exprimierten etwa 50 % der mukosalen CD38⁺⁺ PZ in *H. pylori*-infizierten Patienten iNOS. In den Kontrollen konnten keine mukosalen iNOS-exprimierenden PZ detektiert werden (Abb. 5-6A). Ebenso konnte auch in den peripheren PZ *H. pylori*-infizierter Patienten und Kontrollen kein iNOS nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Außerdem wurde auch eine erhöhte ($P = 0,0159$) IgA-Expression (Median 84 %) in den iNOS⁺ PZ im Vergleich zu allen mukosalen PZ (52 %) gesehen (Abb. 5-6).

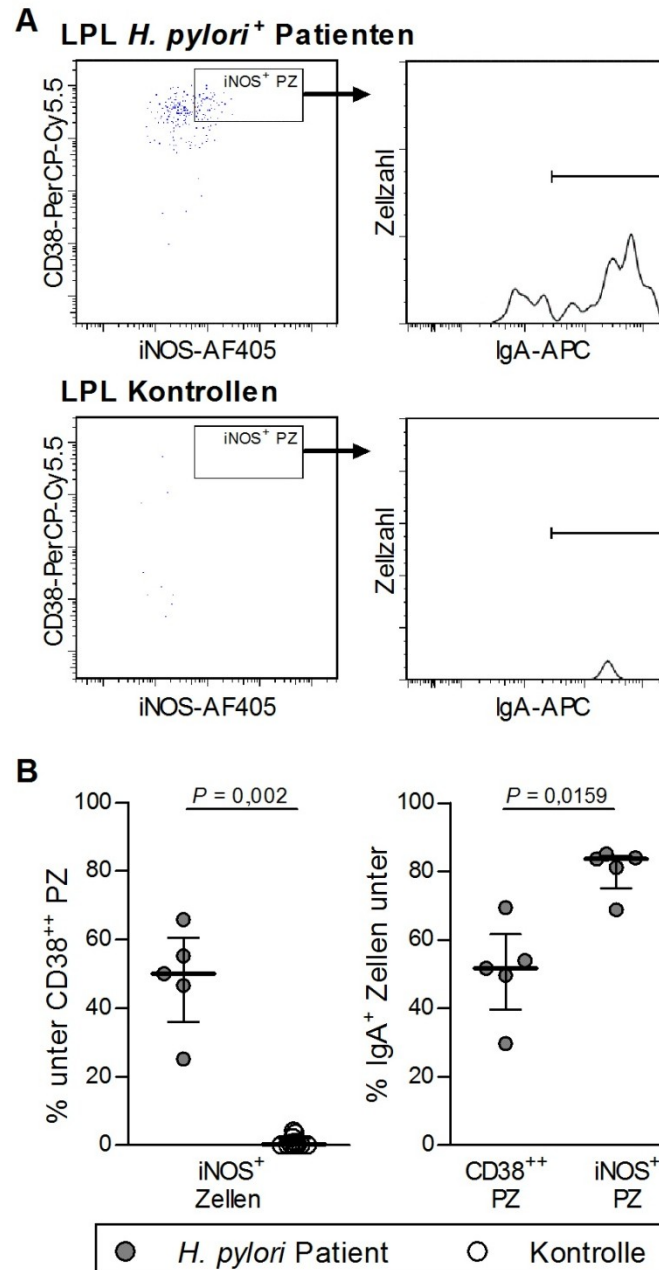


Abbildung 5-6 Verteilung und Analyse iNOS⁺ Plasmazellen in der Magenmukosa von *H. pylori*-Patienten und Kontrollen

A, Repräsentative *Gating*-Strategie für die Analyse der LPLs aus der Magenmukosa von *H. pylori*-Patienten und Kontrollen mittels Durchflusszytometrie: *Links*, *Gating* auf iNOS⁺CD38⁺⁺ Zellen innerhalb der CD3⁻CD14⁻CD19⁺CD45⁺CD20⁻CD27⁺⁺ Plasmazellen (PZ). *Rechts*, Detektion IgA⁺ PZ unter iNOS⁺CD38⁺⁺ PZ **B**, Quantitative Analyse der durchflusszytometrischen Daten entsprechend der *Gating*-Strategie. Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt (Mann-Whitney Test).

5.1.4. Enzymatisch aktives iNOS in mukosalen Plasmazellen *H. pylori*-infizierter Patienten

Da die Präsenz von iNOS-Protein nicht notwendigerweise bedeutet, dass es auch enzymatisch aktiv ist (175), wurde die Funktionalität der iNOS-Enzyme in iNOS⁺ PZ untersucht. Intrazelluläre NO-Produktion wurde mittels Durchflusszytometrie unter Anwendung von

DAF-FM-T (184) untersucht. Die Analyse der LPL, welche aus Magenbiopsaten von infizierten Individuen isoliert wurden (Abb. 5-7), zeigte übereinstimmend, dass ungefähr 70 % aller $CD19^+CD27^{++}CD38^{++}CD20^-CD3^-CD14^-DAPI^-$ PZ zu $DAF-FM-T^+$ PZ wurden, d.h. diese PZ exprimierten enzymatisch aktives iNOS und produzierten NO (Abb. 5-7B).

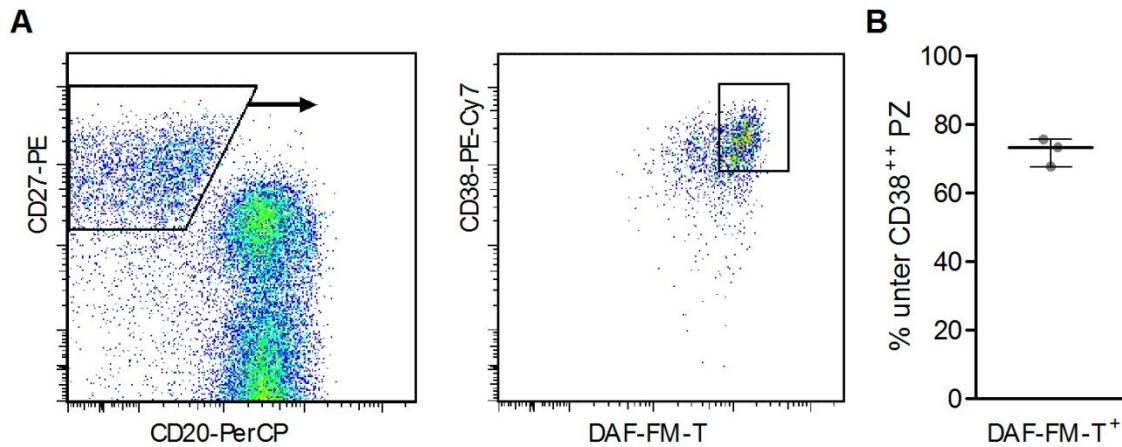


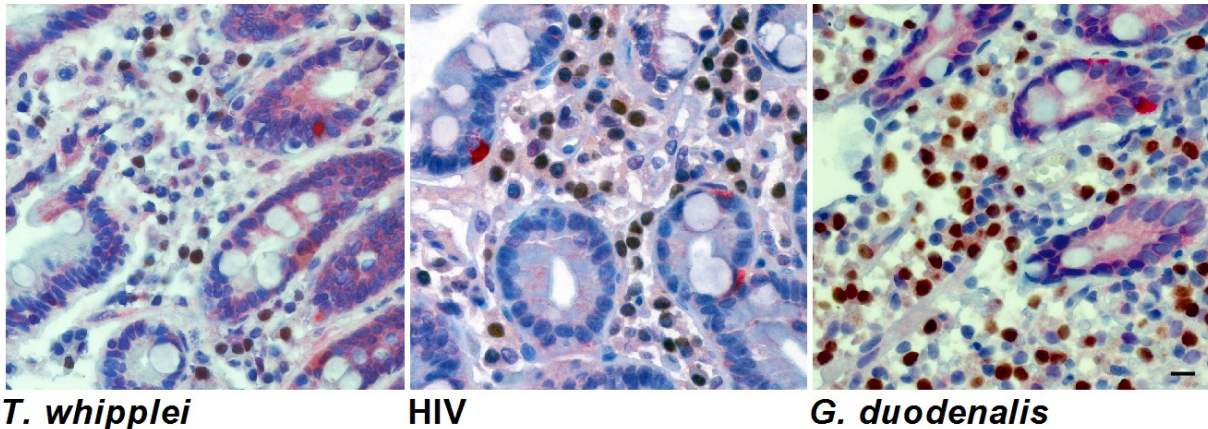
Abbildung 5-7 Nachweis NO-produzierender Plasmazellen in *H. pylori*-infizierten Patienten

A, Repräsentative *Gating*-Strategie für die Analyse $CD19^+CD3^-CD14^-DAPI^-$ Plasmazellen (PZ) von *H. pylori* Patienten mittels Durchflusszytometrie: *Gating* auf PZ ($CD20^-CD27^{++}$) unter allen $CD19^+$ B-Zellen und anschließend auf $CD38^{++}DAF-FM-T^+$ PZ. **B**, Quantitative Analyse der Daten von drei *H. pylori*⁺ Patienten ($n = 3$). Die Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt.

5.1.5. Mukosale iNOS⁺ Plasmazellen fehlen in anderen gastrointestinalen Infektionskrankheiten

Um herauszufinden, ob die Präsenz iNOS⁺ MUM1⁺ PZ eine verbreitete Eigenschaft der Immunantwort gegen gastrointestinale Infektionen darstellt, wurden mukosale Biopsate unbehandelter Patienten mit anderen gastrointestinalen Infektionskrankheiten untersucht, d.h. Patienten infiziert mit i) *Tropheryma whipplei*, ii) humanem Immundefizienz-Virus (HIV) oder iii) *Giardia duodenalis* (syn. *G. lamblia*), einer parasitären Infektion assoziiert mit einer IgA-vermittelten Immunantwort. Keine der immunhistochemisch analysierten Proben der Patienten zeigte iNOS⁺ MUM1⁺ PZ in mukosalen Geweben (Abb. 5-8).

iNOS MUM1



T. whipplei

HIV

G. duodenalis

Abbildung 5-8 Mukosale iNOS⁺ Plasmazellen wurden nicht in duodenalen Biopsaten von *T. whipplei*-, HIV- oder *G. duodenalis*-infizierten Patienten detektiert

Repräsentative immunhistochemische Doppelfärbung auf Paraffinschnitten von duodenalen Biopsaten von *T. whipplei*-, HIV- oder *G. duodenalis*-infizierten Patienten. iNOS-exprimierende Zellen wurden mittels anti-iNOS Antikörper nachgewiesen und Plasmazellen mittels anti-MUM1 Antikörper. Maßstabsbalken zeigt 10 µm.

5.1.6. iNOS-exprimierende B-LZL sind stark aktiviert und produzieren Interferon-γ

Als nächstes wurde untersucht, ob die iNOS-Expression mit BZ-Effektorfunktionen, wie der Zytokin-Produktion, assoziiert ist. Um eine ausreichende Zellzahl sicherzustellen, wurden EBV-transformierte BZ (B-LZL) als Modell genutzt um sowohl die Expression von CD38 und iNOS als auch die Produktion verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-α, IFN-γ, IL-4 und IL-10 zu untersuchen. Entsprechend früherer Studien verändert die EBV-Transformation primärer humaner BZ zahlreiche zelluläre Eigenschaften (194, 195), z.B. die Expression des mit Zellaktivierung assoziierten Antigens CD38 (196) und die iNOS-Expression (197). Weiterhin wurden B-LZL mit einer hochgradigen Heterogenität bezüglich der Expression diverser Zytokine beschrieben (195, 198-203). In den generierten B-LZL wurde die iNOS-Expression lediglich in den stark aktivierten CD38⁺⁺ EBV-infizierten BZ, aber nicht in CD38⁺ oder CD38⁻ BZ (Abb. 5-9) detektiert. Zusätzlich exprimierten die stark aktivierten B-LZL IFN-γ (Abb. 5-9), während IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-α, IL-4 und IL-10 nicht nachgewiesen wurden (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise war die IFN-γ Produktion auf die iNOS-exprimierenden B-LZL begrenzt (Abb. 5-9 *rechts*).

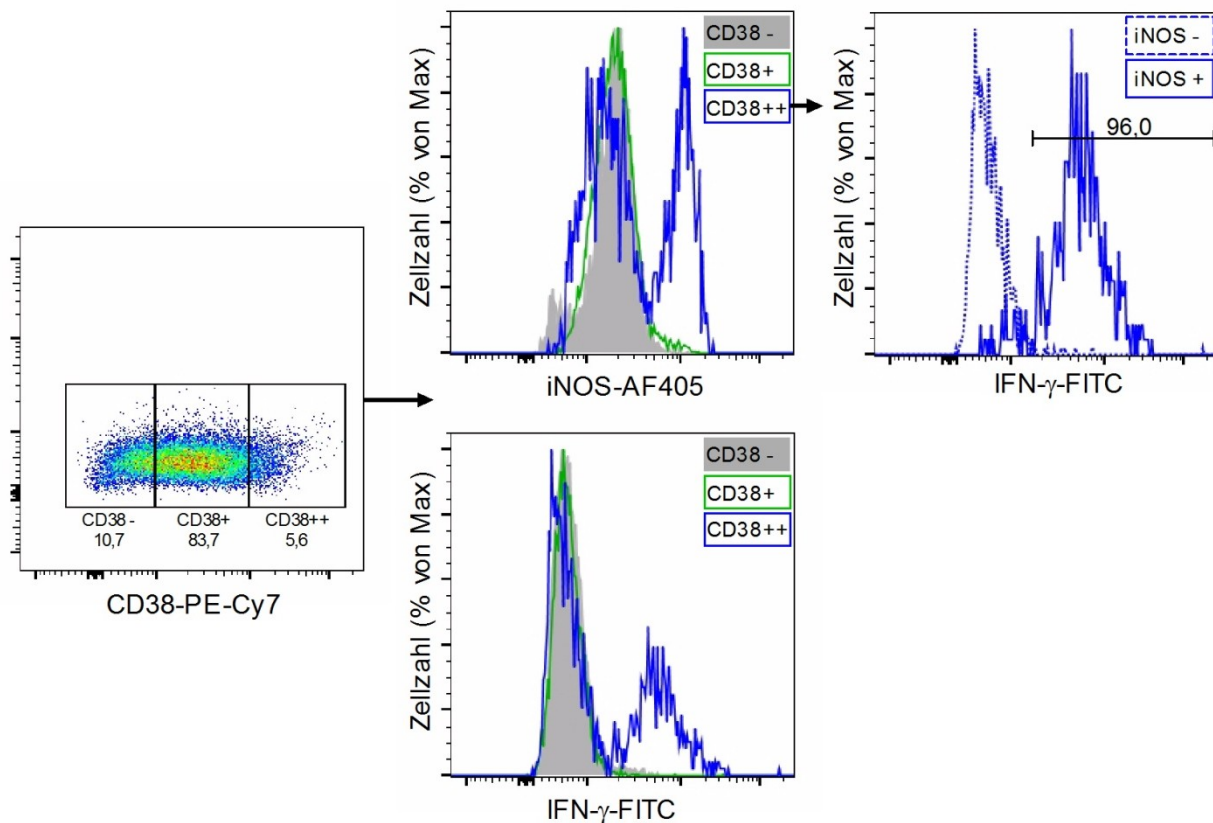


Abbildung 5-9 iNOS-exprimierende B-LZL sind stark aktiviert und produzieren IFN- γ
Links, Gating-Strategie der unterschiedlichen CD38-Expression der B-LZL. *Mitte*, Detektion der intrazellulären iNOS- (oben) bzw. IFN- γ -Expression (unten) innerhalb der CD38⁻, CD38⁺ und CD38⁺⁺ B-LZL mittels Durchflusszytometrie. *Rechts*, IFN- γ -Expression innerhalb der iNOS⁻ (gestrichelte Linie) oder iNOS⁺ (durchgezogene Linie) CD38⁺⁺ B-LZL.

5.1.7. Pro- und anti-inflammatorische Zytokinlevel in Seren und Biopsieüberständen *H. pylori*-infizierter Patienten und Kontrollen

Um Aufschluss über das Zytokinmilieu im peripheren Blut bzw. im Magen zu erhalten, wurden die BZ-assoziierten Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 sowie die pro-inflammatorischen Zytokine IL-2, IFN- γ , TNF- α und IL-6 in Serumproben (Abb. 5-10A) und Biopsieüberständen (Abb. 5-10B) von *H. pylori*-Patienten (n = 8) und Kontrollen (n = 8) gemessen.

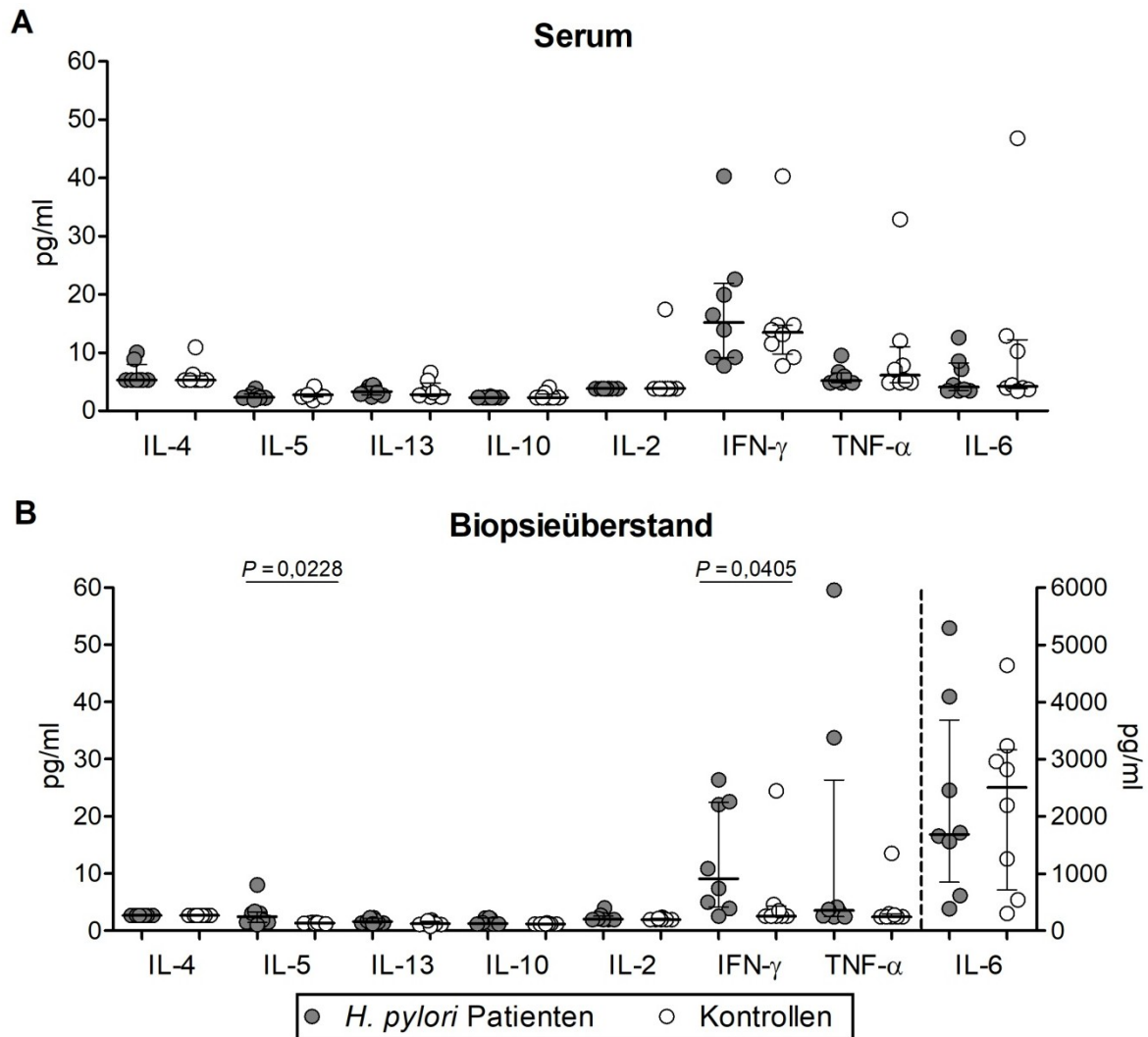


Abbildung 5-10 Konzentrationen pro- und anti-inflammatorischer Zytokine im Serum und Biopsieüberständen *H. pylori*-infizierter Patienten und Kontrollen

Zytokin-Konzentrationen von IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-2, IFN- γ , TNF- α und IL-6 wurden in Serumproben (A) und Biopsieüberständen (B) von *H. pylori*-Patienten ($n = 8$) und Kontrollen ($n = 8$) mit Hilfe eines Legendplex-Kits bestimmt. Die Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt.

Das Zytokinmilieu in den Serumproben unterschied sich nicht zwischen den Patienten und den Kontrollen (Abb. 5-10A). IFN- γ wies die vergleichsweise höchste Konzentration auf (Median *H. pylori*: 15,2 pg/ml und Kontrollen: 13,5 pg/ml), gefolgt von TNF- α (5,2 pg/ml bzw. 6,2 pg/ml) und IL-4 (beide 5,3 pg/ml). Im Gegensatz zu den Serumproben zeigten sich Unterschiede zwischen *H. pylori*-Patienten und Kontrollen hinsichtlich der Zytokin-Konzentrationen der Biopsieüberstände (Abb. 5-10B). Überstände der *H. pylori*-Patienten enthielten signifikant höhere ($P = 0,0228$) IL-5-Konzentrationen (Median 2,46 pg/ml) als die Überstände der Kontrollen (1,35 pg/ml). Zusätzlich zeigten sich auch erhöhte ($P = 0,0405$) IFN- γ -Konzentrationen in den Biopsieüberständen der *H. pylori*-Patienten (Median 9,1 pg/ml) im Vergleich zu Kontrollen (2,6 pg/ml). Weiterhin waren die IL-6-Konzentrationen in den

Biopsieüberständen (Median 1685 pg/ml bzw. 2506 pg/ml) sehr viel höher als in den Serumproben (beides 4 pg/ml), wohingegen die Konzentrationen von IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-2, IFN- γ und TNF- α in den Serumproben und Biopsieüberständen vergleichbar waren (Abb. 5-10).

5.1.8. Mukosale iNOS-exprimierende memory B-Zellen und Plasmazellen *H. pylori*-infizierter Patienten produzieren pro- und anti-inflammatorische Zytokine

Zusätzlich zu den Zytokin-Konzentrationen im Serum und den Biopsieüberständen, welche auf alle im Blut bzw. in der Mukosa befindlichen Immunzellen zurückzuführen ist, wurden die Zytokin-Genexpressionsmuster von B-Linienzellen während einer *H. pylori*-Infektion untersucht. PZ und mBZ isolierter LPL und PBMC eines *H. pylori*-infizierten Patienten wurden im Hinblick auf die relative Genexpression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine mittels qPCR analysiert. Sowohl in mukosalen als auch in peripheren mBZ konnte die mRNA-Expression von IFN- γ und TNF- α sowie IL-10 nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten mukosale mBZ ein höheres relatives Expressionslevel von IFN- γ , TNF- α und IL-10 mRNA als periphere mBZ (Abb. 5-11). In PZ wurde keine mRNA-Expression für IFN- γ , TNF- α und IL-10 mittels qPCR gemessen.

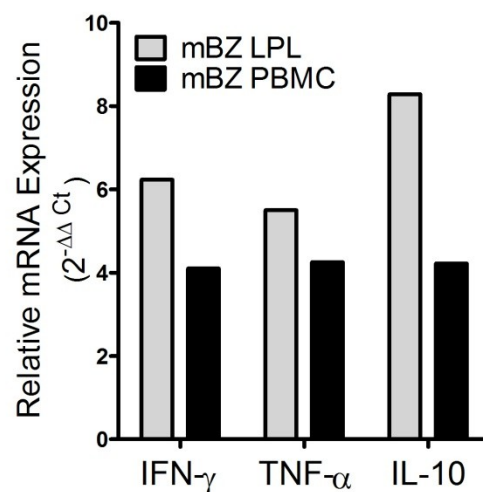


Abbildung 5-11 *H. pylori*-infizierte Patienten produzieren eine höhere Menge an mRNA pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in mukosalen als in peripheren *memory* B-Zellen

Relative mRNA Expression von IFN- γ , TNF- α und IL-10 in peripheren oder mukosalen *memory* B-Zellen (mBZ) während einer *H. pylori*-Infektion.

mBZ (CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD38⁻CD3⁻CD14⁻DAPI⁺) wurden durchflusszytometrisch von PBMC bzw. LPL isoliert. qPCR Daten wurden analysiert mittels vergleichender C_t Methode ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Alle Werte wurden normalisiert zu der Expression des Haushaltgens *GAPDH* und des Referenzgens *IL-6*.

Weiterhin wurden isolierte LPL eines *H. pylori*-Patienten durchflusszytometrisch charakterisiert. Die Analyse zeigte, dass 2,8 % aller mukosaler mBZ ($CD19^+CD20^+CD27^+CD38^-$) ebenfalls iNOS exprimierten (Abb. 5-12). Die intrazelluläre Zytokinfärbung mukosaler PZ und mBZ demonstrierte eine Ko-Expression von IFN- γ und TNF- α in iNOS-exprimierenden mBZ (33,1 %, Abb. 5-12), aber nicht in iNOS $^-$ mBZ. Hinsichtlich der PZ konnte, im Vergleich mit iNOS $^-$ Zellen, eine leicht erhöhte TNF- α -Expression in den mukosalen iNOS-exprimierenden PZ detektiert werden (15,1 %, Abb. 5-13).

memory B-Zellen

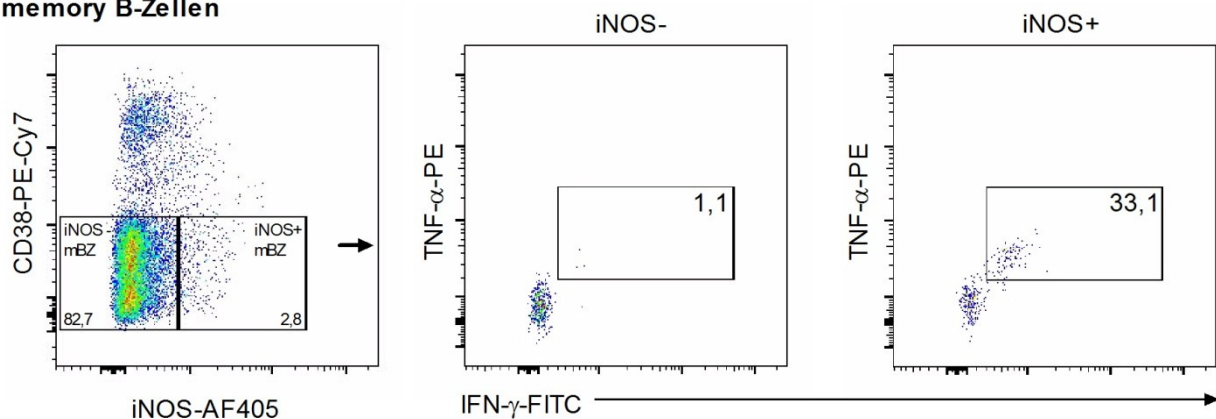


Abbildung 5-12 Zytokin-Expression mukosaler *memory* B-Zellen aus *H. pylori*-infizierten Patienten

Detektion von intrazellulärem TNF- α und IFN- γ innerhalb mukosaler iNOS $^-$ und iNOS $^+$ *memory* B-Zellen (mBZ, $CD19^+CD20^+CD27^+CD38^-CD3^-CD14^-$) eines *H. pylori*-infizierten Patienten mittels Durchflusszytometrie. Prozente sind angegeben.

Plasmazellen

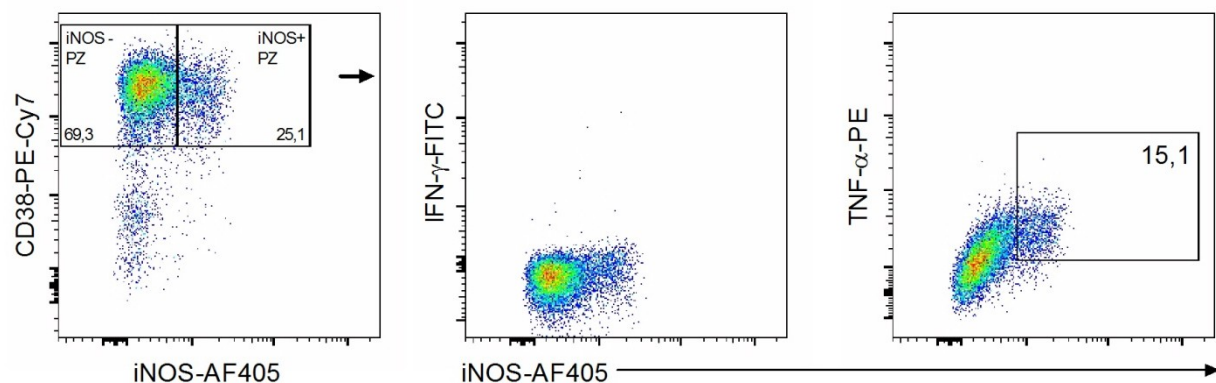


Abbildung 5-13 Zytokin-Expression mukosaler Plasmazellen aus *H. pylori*-infizierten Patienten

Detektion von intrazellulärem TNF- α und IFN- γ innerhalb mukosaler iNOS $^-$ und iNOS $^+$ Plasmazellen eines *H. pylori*-infizierten Patienten (PZ, $CD19^+CD20^-CD27^{++}CD38^{++}CD3^-CD14^-$) mittels Durchflusszytometrie. Prozente sind angegeben.

5.2. Molekularbiologische Charakterisierung mukosaler Plasmazellen im Kontext einer chronischen *H. pylori*-Infektion

Die molekularbiologische Charakterisierung des Ig-Repertoires hinsichtlich ihrer Sequenz war unerlässlich, insbesondere im Hinblick auf den Einfluss der iNOS-Expression in PZ. Um diese Aspekte zu untersuchen, wurden die PZ durchflusszytometrisch in Einzelzellen sortiert, aufgeschlossen, die enthaltene cDNA in mRNA umgeschrieben und mittels einer *nested* PCR die exprimierten schweren Ig-Kettengene amplifiziert. Durch die anschließende Sequenzierung dieser Amplifikate wurden Informationen zu Isotyp, VDJ-Rekombination, CDRH3-Längen und Mutationen gewonnen.

Diese Analyse wurde zunächst für CD19⁺CD38⁺⁺CD20⁻CD3⁻ PZ eines Patienten (HP1) durchgeführt. Später wurden dann zwei weitere *H. pylori*-Patienten (HP2 und 3) untersucht, bei denen zwischen iNOS⁺ (CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺CD20⁻CD3⁻CD14⁻DAPI⁻DAF-FM-T⁺) und iNOS⁻ PZ (CD19⁺CD27⁺⁺CD38⁺⁺CD20⁻CD3⁻CD14⁻DAPI⁻DAF-FM-T⁻) differenziert wurde. Die zur Sortierung verwendete *Gating*-Strategie ist in Abbildung 5-14 dargestellt.

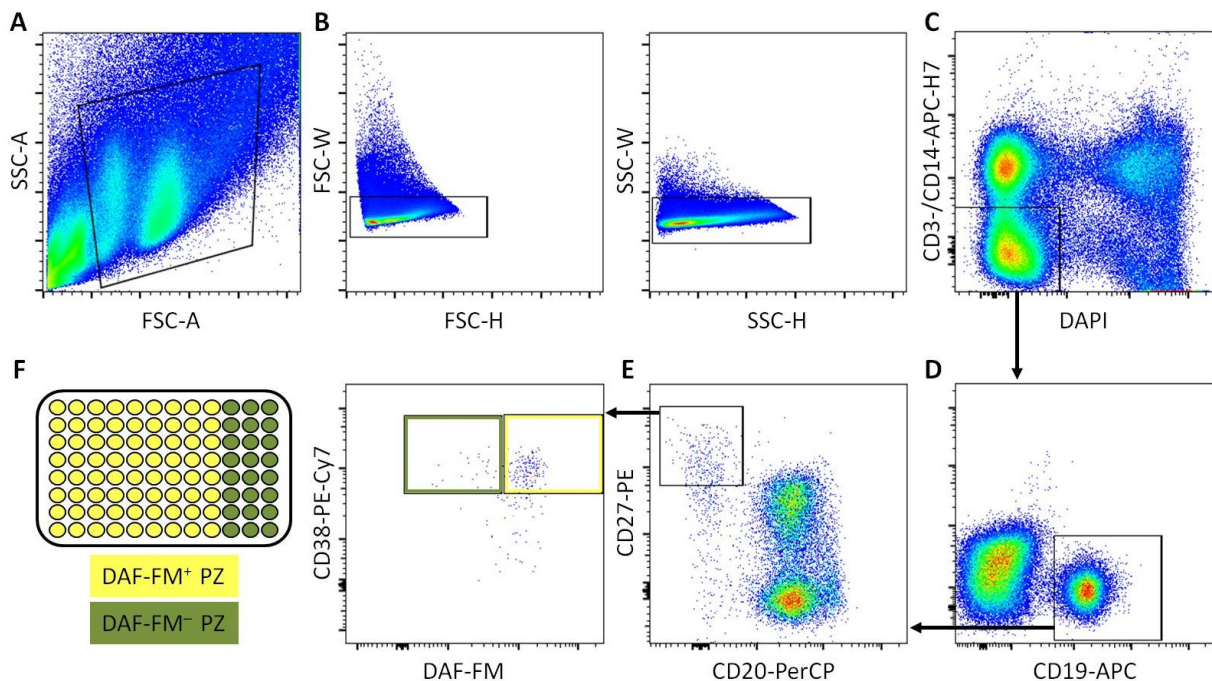


Abbildung 5-14 *Gating*-Strategie zur Sortierung DAF-FM⁻ und DAF-FM⁺ Plasmazellen

Repräsentative *Gating*-Strategie für die Einzelzell-Sortierung der LPLs von *H. pylori*-infizierten Patienten: **A**, *Gating* auf Lymphozyten durch Vorwärts- (FSC) und Seitwärts (SSC) Streuungseigenschaften; **B**, Ausschluss von Zellaggregaten; **C**, Ausschluss von T-Zellen (CD3⁺) und Monozyten (CD14⁺) und lebenden DAPI⁻ Zellen; **D**, *Gating* auf CD19⁺ B-Zellen; **E**, Detektion von Plasmazellen (PZ, CD20⁻CD27⁺⁺); **F**, Sortierung von 72 DAF-FM⁺ und 24 DAF-FM⁻ CD38⁺⁺ PZ in eine 96-Well-Platte.

Insgesamt wurden 149 PCR-Produkte gereinigt und sequenziert. Davon ergaben 124 eine produktive, auswertbare Sequenz, die in die weiteren Untersuchungen einbezogen wurden. Von HP1 konnten bei 30 PZ, von HP2 bei 47 iNOS⁺ PZ und 9 iNOS⁻ PZ und von HP3 bei 30 iNOS⁺ PZ und 8 iNOS⁻ PZ die IgH-Gene erfolgreich sequenziert werden. Die erhaltenen Sequenzen wurden für jeden Probanden einzeln untersucht und die Ergebnisse anschließend miteinander verglichen.

5.2.1. iNOS-exprimierende Plasmazellen zeigten ein hohes Vorkommen des IgA1 Isotypen

Zur Ermittlung der Ig-Isotypen der sortierten PZ wurden die erhaltenen Sequenzen mit genomischen Sequenzen der konstanten C-Regionen verglichen. Die Verteilung der Ig-Isotypen ist in Abbildung 5-15 dargestellt und war zwischen den drei *H. pylori*-Patienten (HP1-3) ähnlich. Der am häufigsten exprimierte Ig-Isotyp war der IgA-Isotyp; ca. 84 % der PZ von HP1, 90 % der PZ von HP2 und 87 % der PZ von HP3 exprimierten diesen Isotyp. Die am häufigsten exprimierten Subtypen waren IgA₁, gefolgt von IgA₂, IgG₁, IgG₂ und IgG₃. Der IgM-Isotyp und die IgG-Subklasse IgG₄ wurden nicht unter den analysierten Sequenzen gefunden.

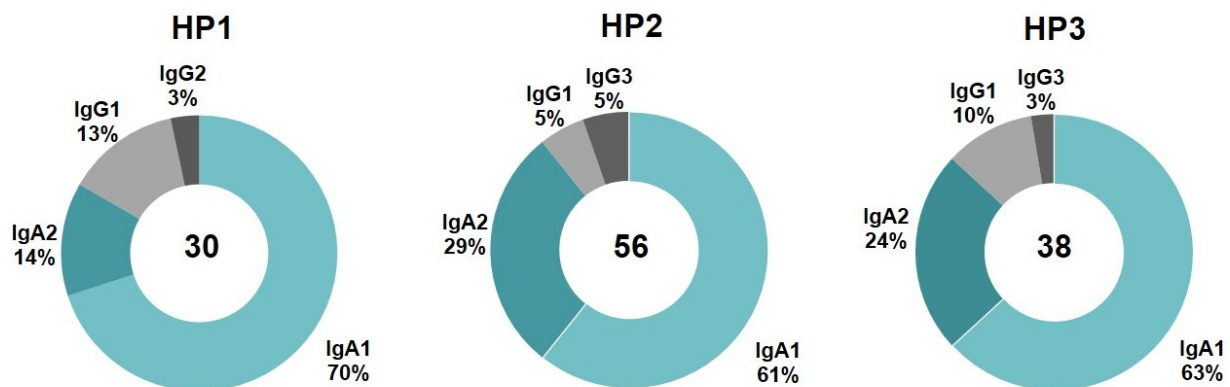


Abbildung 5-15 Verteilung der Immunglobulin-Subklassen mukosaler Plasmazellen aus drei *H. pylori*-infizierten Spendern

Die absolute Anzahl analysierter Sequenzen ist im Zentrum der Kreisdiagramme angegeben.

Bei Betrachtung der iNOS⁺ und iNOS⁻ Subpopulationen zeigte sich ebenfalls kein Unterschied hinsichtlich der Verteilung der Isotypen (Abb. 5-16). Interessanterweise war der Anteil des Isotyps IgG an allen Igs unter den iNOS⁻ PZ bei HP2 (33 %) höher als in iNOS⁺ PZ (6 %) (Abb. 5-16). Zusätzlich verhielt sich das Verhältnis von IgA1 zu IgA2 bei den iNOS⁻ PZ von HP2 konträr, denn der Anteil des Subtyps IgA1 war hier halb so groß wie der von IgA2 an allen PZ. Diese unterschiedliche Verteilung der Isotypen und Subtypen der iNOS⁻ PZ könnte

allerdings auf die geringe Anzahl an $iNOS^-$ PZ ($n=9$), die in die Analyse eingegangen sind, zurückzuführen sein.

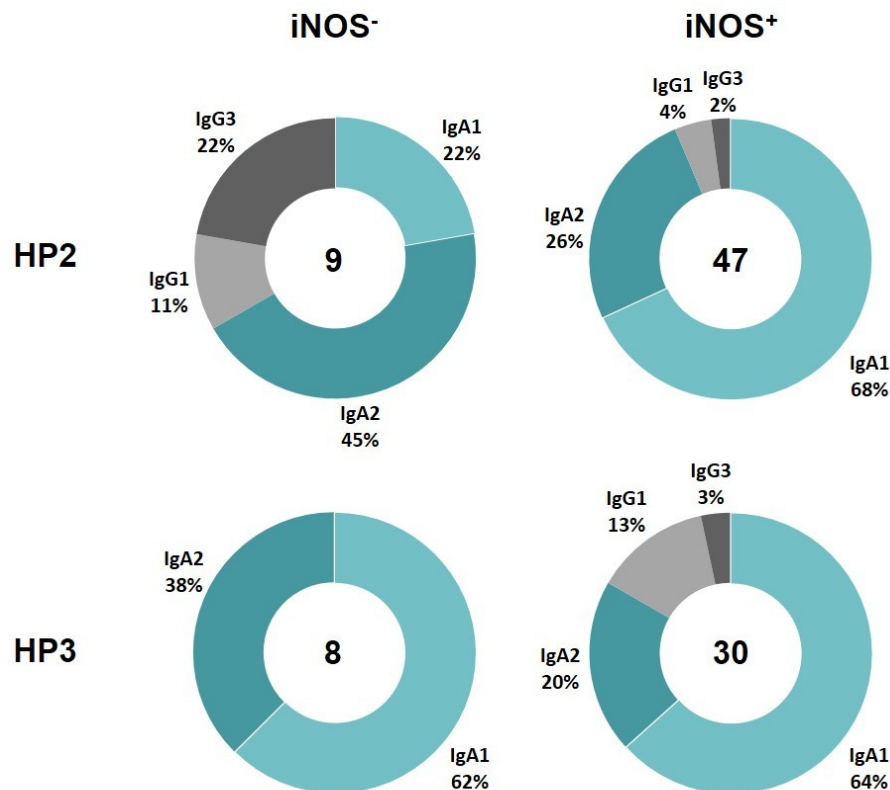


Abbildung 5-16 Verteilung der Immunglobulin-Subklassen mukosaler $iNOS^-$ bzw. $iNOS^+$ Plasmazellen von zwei *H. pylori*-infizierten Spendern.

Die absolute Anzahl analysierter Sequenzen ist im Zentrum der Kreisdiagramme angegeben.

5.2.2. Vergleichbare Nutzung der V_H - und J_H -Gensegmente in $iNOS^+$ und $iNOS^-$ Plasmazellen

Eine der stärksten strukturellen Einschränkungen der Reaktivität eines Antikörpers gegen ein Antigen wird durch die Segmente der variablen Region bestimmt. Daher wurde das Gen-Repertoire der variablen Regionen der schweren Antikörperketten genauer untersucht. Diese Analyse bestand in der Beschreibung der V_H - und J_H -Segmente und deren Familienverteilung für jede Sequenz. Es wurden insgesamt 35 verschiedene V_H -Gensegmente aus sechs V_H -Familien nachgewiesen (Abb. 5-17 und 5-18). Auffällig ist die häufige Nutzung der V_H3 - und V_H4 -Gensegmente bei allen Patienten sowie V_H1 -Gensegmente bei HP1 und HP2. V_H -Gensegmente der V_H6 -Familie wurden bei den untersuchten Zellen nicht gefunden. Hinsichtlich der V_H -Familien-Verteilung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen $iNOS^-$ und $iNOS^+$ PZ festgestellt werden. Der Vergleich dieser Daten mit Werten IgA⁺ PZ aus dem Darm eines gesunden Spenders (204) zeigte eine ähnliche Verteilung der V_H -Familien (Abb. 5-17).

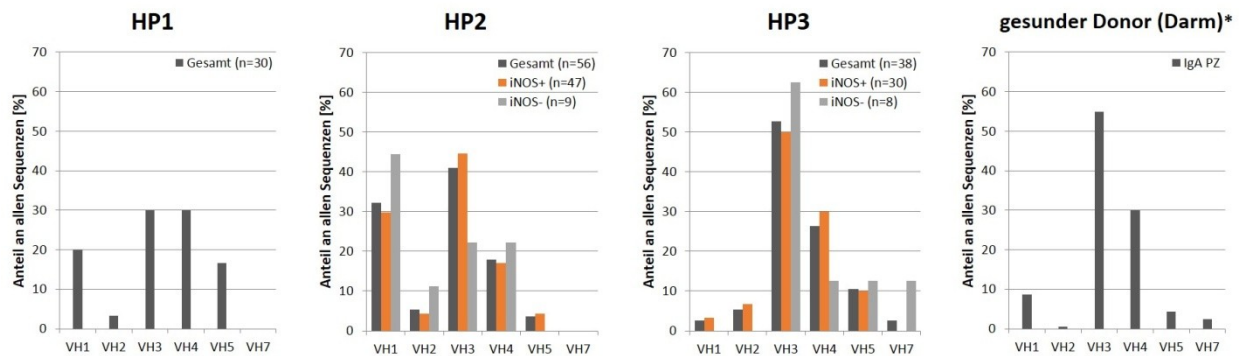


Abbildung 5-17 V_H-Familien-Nutzung innerhalb der exprimierten variablen Region der schweren Immunglobulinketten mukosaler Plasmazellen aus drei *H. pylori*-Patienten

Verteilung der Nutzung der verschiedenen V_H-Familien bei Plasmazellen (PZ) aus drei *H. pylori*-Patienten (HP1-3) sowie iNOS⁻ und iNOS⁺ PZ. Es ist jeweils der Anteil an allen untersuchten Sequenzen einer Subpopulation angegeben. Die absolute Anzahl analysierter Sequenzen ist in der Legende angegeben. Als Orientierungswerte sind die Anteile der V_H-Familien IgA⁺ PZ* aus dem Darm gesunder Probanden dargestellt (rechts) (204).

Die detaillierte Analyse der individuellen V_H-Gensegmente ergab, dass die PZ-Klone nicht zufällig über das gesamte Gen-Repertoire selektiert wurden, d.h., einige Segmente waren überrepräsentiert, während andere nicht auftraten. (Abb. 5-18).

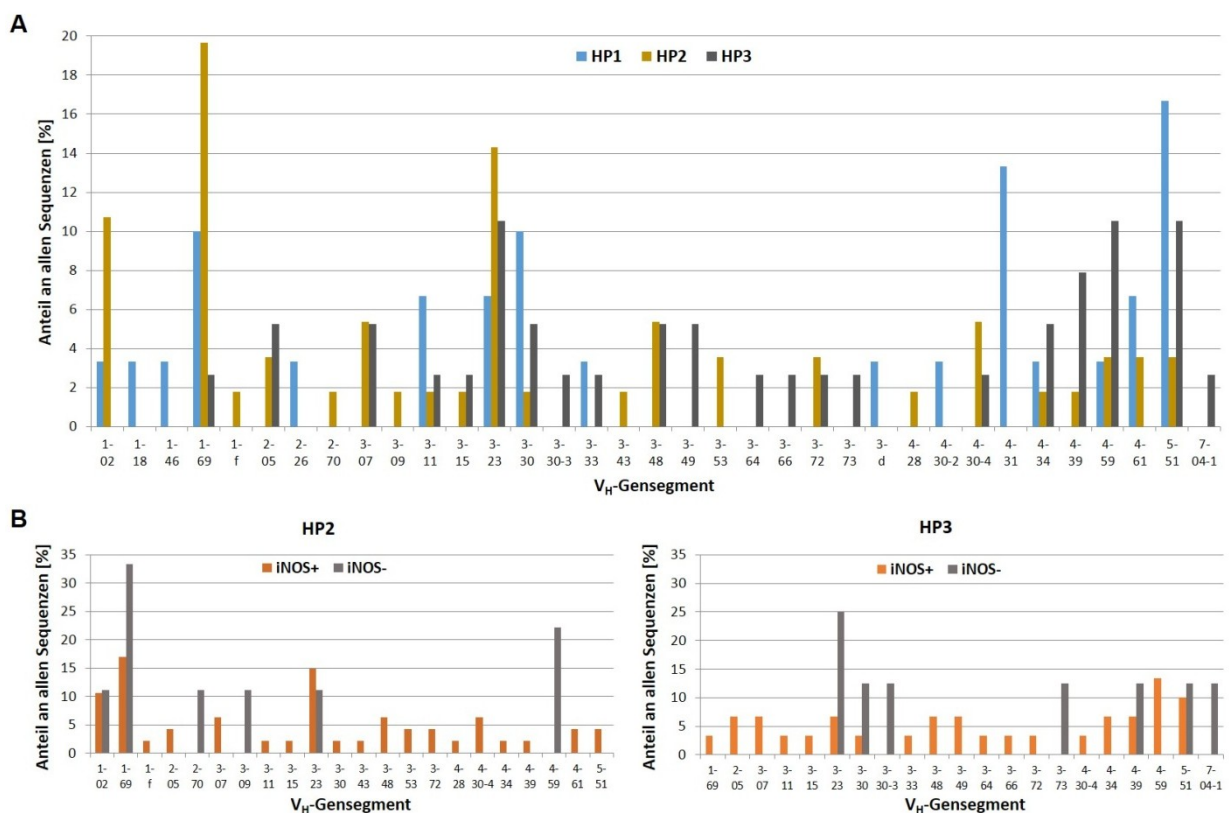


Abbildung 5-18 V_H-Gen-Nutzung innerhalb der exprimierten variablen Region der schweren Immunglobulinketten mukosaler Plasmazellen aus drei *H. pylori*-Patienten

A, Verteilung der V_H-Gensegment-Nutzung bei mukosalen Plasmazellen (PZ) aus drei *H. pylori*-Patienten (HP1-3) sowie **B**, V_H-Gensegment-Nutzung iNOS⁻ und iNOS⁺ PZ innerhalb von HP2 bzw. HP3. Es ist jeweils der Anteil an allen untersuchten Sequenzen einer Subpopulation angegeben.

Für Spender HP1 wurden insgesamt 16, für HP2 20 und für HP3 22 verschiedene V_H -Gensegmente nachgewiesen (Abb. 5-18A). Aufgrund des zum Teil einmaligen Auftretens eines Gensegmentes wurde keine weitere statistische Analyse durchgeführt. Dennoch ist das wiederholte Auftreten der sieben V_H -Gensegmente V_{H1-69} , V_{H3-11} , V_{H3-23} , V_{H3-30} , V_{H4-34} , V_{H4-59} , V_{H5-51} in allen drei Spendern auffällig. Weiterhin traten zehn der genutzten Gensegmente bei jeweils zwei *H. pylori*-Patienten auf und die übrigen 18 jeweils nur in einem Spender (Abb. 5-18A). Der Vergleich $iNOS^-$ und $iNOS^+$ PZ in den Spendern HP2 und HP3 ergab keinen eindeutigen Unterschied hinsichtlich der Nutzung verschiedener V_H -Gensegmenten (Abb. 5-18B).

Die Analyse der genutzten J_H -Gensegmente ergab die in Abbildung 5-19 dargestellten J_H -Familienverteilungen. Es waren alle bekannten funktionellen J_H -Familien der mukosalen PZ-Repertoires der Patienten in vergleichbarer Verteilung zu finden. Auch bei dem Vergleich der J_H -Familienverteilungen zwischen $iNOS^-$ und $iNOS^+$ PZ bei HP2 bzw. HP3 zeigten sich keine Unterschiede. Auffällig war die häufige Nutzung von J_{H4} -Gensegmenten in allen drei Patienten (HP1: 23 %, HP2: 76 %, HP3: 39 %), die mit Daten mukosaler IgA^+ PZ aus dem Darm eines gesunden Spenders übereinstimmte (J_{H4} : 49 %, Abb. 5-19) (204). Interessanterweise zeigten alle PZ-Repertoires der Patienten (HP1: 40 %, HP2: 32 %, HP3: 34 %) im Vergleich zu dem Kontroll-Repertoire (J_{H6} : 14 %) eine häufigere Nutzung der J_{H6} -Genfamilie, unter den untersuchten Sequenzen von HP1 sogar die häufigste Nutzung gefolgt von der Nutzung der J_{H4} -Genfamilie. Die J_H -Genfamilien J_{H1} und J_{H2} wurden in den PZ-Repertoires der Patienten (max. 13 % J_{H2} bei $iNOS^-$ PZ von HP3) ebenso wie in dem Kontroll-Repertoire (max. 3 % J_{H2}) eher selten genutzt.

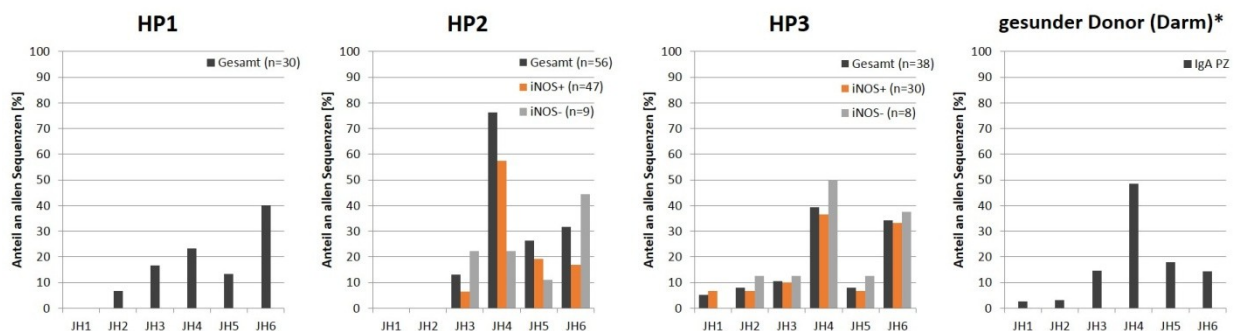


Abbildung 5-19 J_H -Familien-Nutzung innerhalb der exprimierten variablen Region der schweren Immunglobulinketten mukosaler Plasmazellen aus drei *H. pylori*-Patienten

Verteilung der Nutzung der verschiedenen J_H -Familien bei Plasmazellen (PZ) aus drei *H. pylori*-Patienten (HP1-3) sowie $iNOS^-$ und $iNOS^+$ PZ. Es ist jeweils der Anteil an allen untersuchten Sequenzen einer Subpopulation angegeben. Die absolute Anzahl analysierter Sequenzen ist in der Legende angegeben. Als Orientierungswerte sind die Anteile der J_H -Familien IgA^+ -PZ* aus dem Darm gesunder Probanden dargestellt (rechts) (204).

Zusammenfassend ergab die Analyse der Nutzung der V_H und J_H -Gensegmente, dass sich die PZ der drei *H. pylori*-Patienten bzw. der beiden PZ-Subpopulationen $iNOS^-$ und $iNOS^+$ PZ hinsichtlich ihrer Nutzung der zur Verfügung stehenden V_H - und J_H -Gensegmente nicht wesentlich unterschieden.

Des Weiteren wurde die Rekombination der V_H -Segmente zu den J_H -Familien untersucht. Mitglieder der V_{H3} - und V_{H4} -Genfamilie wurden am häufigsten in Rekombination mit der J_{H4} - oder J_{H6} -Familie gefunden (Abb. 5-20A). So wurde in HP1 am häufigsten die Kombination V_{H4} - J_{H6} (17,2 %) und V_{H3} - J_{H4} (13,8 %), in HP2 am häufigsten V_{H3} - J_{H4} (26,8 %) und in HP3 am häufigsten V_{H3} - J_{H6} (21,1 %) und V_{H4} - J_{H6} (18,4 %) gefunden.

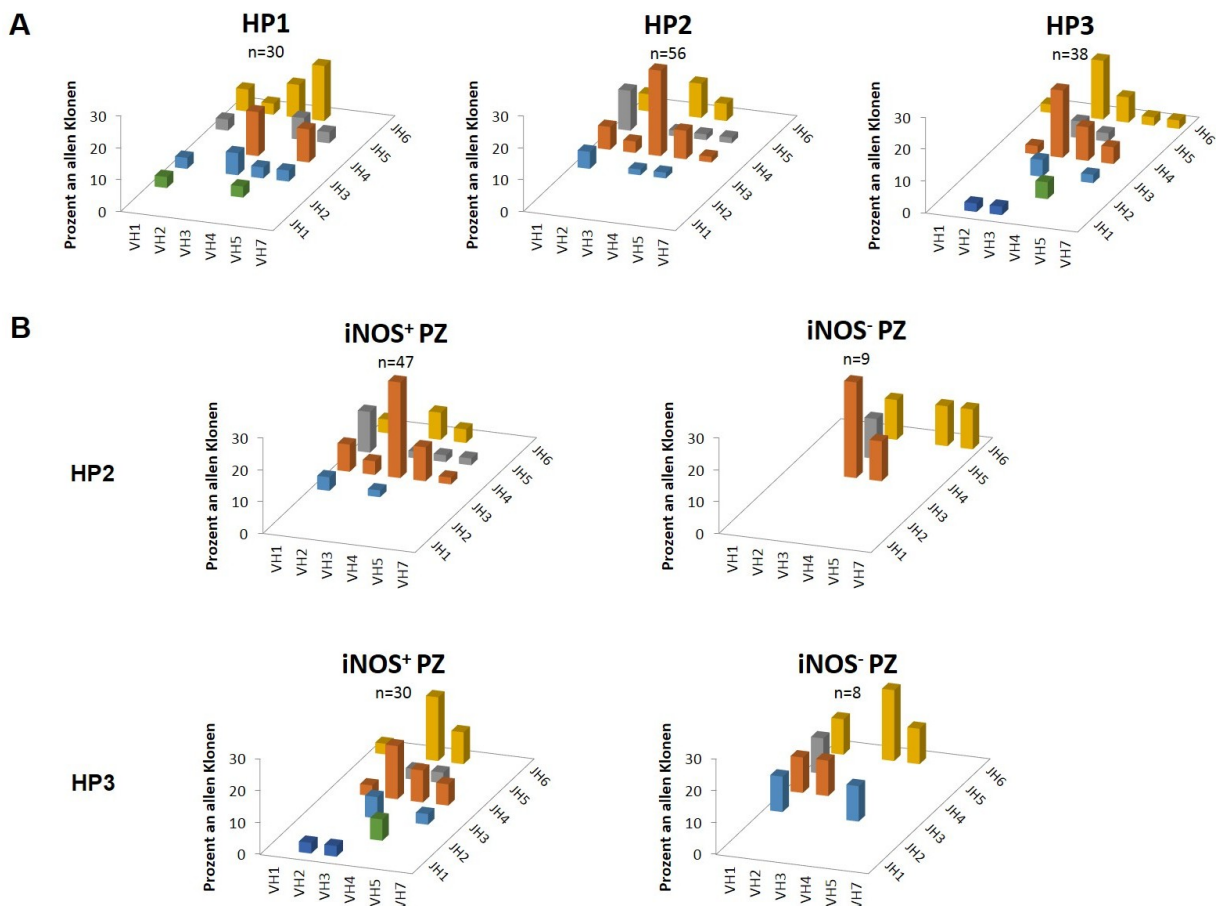


Abbildung 5-20 Nutzung der V_H - zu J_H -Familiensegment-Kombinationen mukosaler Plasmazellen von *H. pylori*-Patienten.

A, Verteilung der Nutzung der verschiedenen V_H - J_H -Familiensegment-Kombinationen bei mukosalen Plasmazellen (PZ) aus drei *H. pylori*-Patienten (HP1-3) sowie **B**, die V_H - J_H -Familiensegment-Kombinationen $iNOS^-$ und $iNOS^+$ PZ innerhalb von HP2 bzw. HP3. Es ist jeweils der Anteil an allen untersuchten Sequenzen eines Patienten angegeben. Die absolute Anzahl analysierter Sequenzen ist angegeben.

Bei genauerer Betrachtung der jeweiligen V_H -Gensegmente fällt auf, dass die häufigste Rekombination in allen Patienten V_{H3} -23 mit J_{H4} war (HP1: 6,9 %; HP2: $iNOS^+$ PZ 14,9 %;

HP3: iNOS⁺ PZ 6,7 % und iNOS⁻ PZ 25 %) (Abb. 5-21). In dem PZ-Repertoire von HP1 und den iNOS⁺ PZ von HP3 trat ebenfalls häufig die Kombination V_H5-51 mit der J_H4-Familie auf (10,3 % bzw. 6,7 %), und die Kombination V_H1-69 mit J_H6 trat in jedem Repertoire auf, außer in iNOS⁻ PZ von HP3.

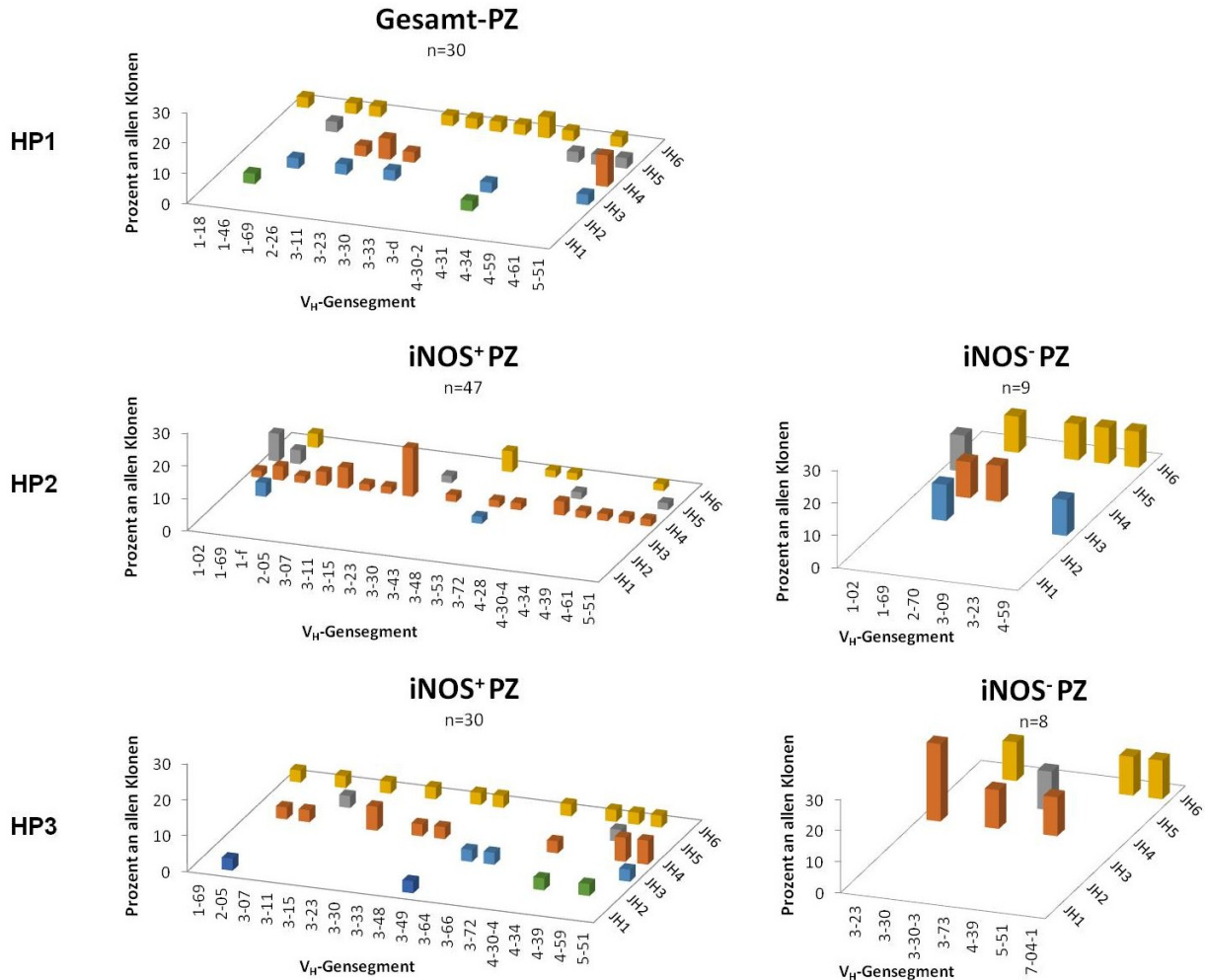


Abbildung 5-21 Nutzung der Kombinationen von V_H-Gensegmenten zu J_H-Familiensegmenten mukosaler Plasmazellen aus drei *H. pylori*-Patienten

Verteilung der Nutzung der verschiedenen V_H-Gen-J_H-Familien-Kombinationen bei mukosalen Plasmazellen (PZ) aus drei *H. pylori*-Patienten (HP1-3) sowie der iNOS⁻ und iNOS⁺ PZ-Subpopulationen innerhalb von HP2 bzw. HP3. Es ist jeweils der Anteil an allen untersuchten Sequenzen einer Subpopulation angegeben.

5.2.3. Ähnliche Häufigkeit und Verteilung somatischer Hypermutationen in V_H-Regionen der iNOS⁺ und iNOS⁻ Plasmazellen

Um den jeweiligen Reifungsstatus der PZ einschätzen zu können, wurde die Häufigkeit somatischer Hypermutationen (SHM) in den V_H-Regionen (FWR1-FWR3) durch Vergleich mit der aus der Keimbahn vorhergesagten Gensequenz analysiert. Insgesamt setzten sich die zu analysierenden Sequenzen (V_H-Regionen) durchschnittlich aus 222bp (216-228bp) zusammen (Tab. 5-1). Die innerhalb der V_H-Regionen registrierten Mutationen der PZ der

drei Patienten verteilten sich auf diese Region und ergaben die in Abbildung 5-22A dargestellte Verteilung der Mutationsfrequenzen.

Tabelle 5-1 Molekulare Eigenschaften der exprimierten IgH-Sequenzen der Plasmazellen (PZ) von *H. pylori*-Patienten

Patient	PZ- Population	Anzahl der Sequenzen	Länge der V _H -Region [bp] Median (Quartile)	Anz. der Mutationen Median (Quartile)	Mutations- häufigkeit [%] Median (Quartile)	akkumulierte R/S- Verhältnisse CDRH1+2	akkumulierte R/S- Verhältnisse FWR1-3
HP1	Gesamt-PZ	30	219 (216-225)	26 (21-34)	12 (9,7-15)	2,7	1,7
HP2	iNOS pos	47	222 (216-228)	31 (24-37)	13,8 (11,7-17,4)	3,3	1,7
	iNOS neg	9	225 (217,5-228)	34 (26,5-46)	15,5 (11,6-21,4)	3,8	1,4
HP3	iNOS pos	30	228 (216-231)	28 (19-36,25)	13 (9,9-16,1)	2,8	2,1
	iNOS neg	8	223,5 (165,5-231)	25,5 (17-29,75)	13 (10,4-16,7)	3,1	2,2

Die Analyse zeigte, dass alle untersuchten IgH-Sequenzen aller drei Patienten mutiert vorlagen. Interessanterweise waren diese sogar mit einer Mutationshäufigkeit ≥ 10 % stark mutiert, d.h. sie trugen mehr als ca. 22 Mutationen in ihren exprimierten V_H-Regionen. Für Patient HP1 zeigten 76 %, für HP2 84 % und für HP3 74 % aller Sequenzen eine Mutationshäufigkeit ≥ 10 %. Das gesamte analysierte PZ-Repertoire von Patient HP1 hatte eine durchschnittliche Mutationsfrequenz von 12 %, Patient HP2 zeigte bei iNOS⁺ PZ 13,8 % und bei iNOS⁻ PZ 15,5 % und Patient HP3 wies bei iNOS⁻ und iNOS⁺ eine durchschnittliche Mutationshäufigkeit von 13 % auf. Insgesamt gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Häufigkeiten an Mutationen in den V_H-Regionen der verschiedenen PZ-Repertoires. Interessant ist jedoch, dass die hier untersuchten PZ-Repertoires alle eine deutlich größere Mutationshäufigkeit aufwiesen als der durchschnittliche Kontrollwert IgA⁺-PZ aus dem Darm eines Gesunden, welcher bei 7,1 % lag (IgG: 7,6 %) (Abb. 5-22A) (204).

Um die Mutationshäufigkeiten zwischen den Subpopulationen genauer zu untersuchen, wurden die Frequenzen getrennt nach den Ig-Isotypen betrachtet. Dabei zeigte sich, dass sich die zu vergleichenden Subpopulationen in ihren durchschnittlichen Mutationsfrequenzen nicht signifikant unterschieden (Abb. 5-22B).

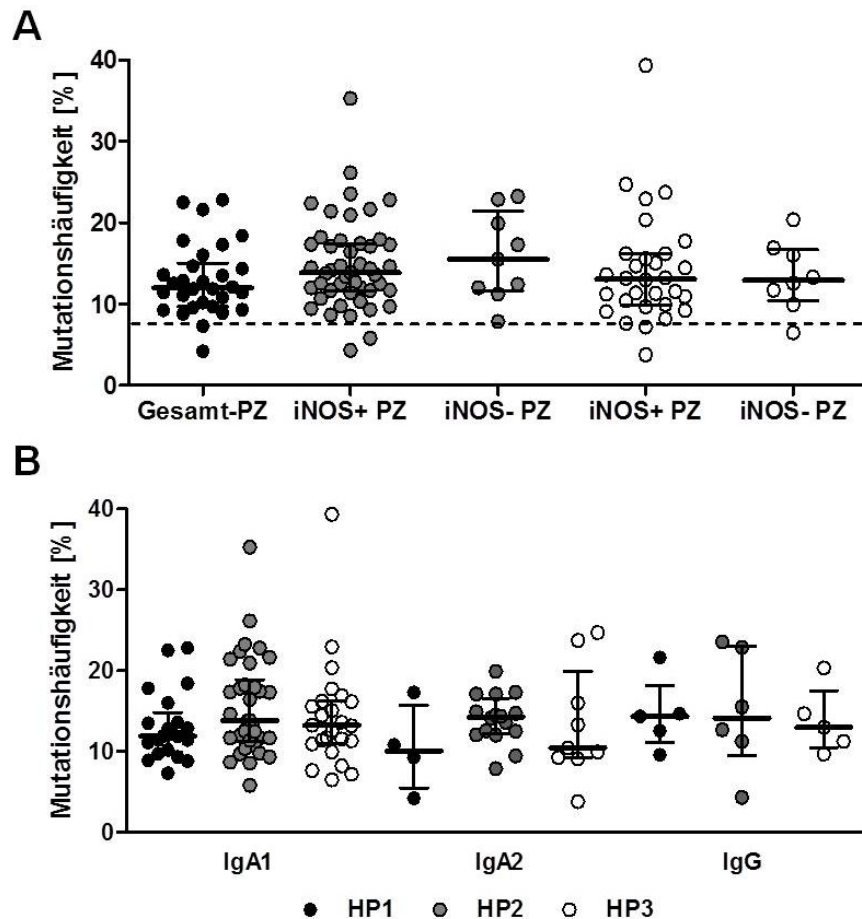


Abbildung 5-22 Somatische Hypermutation innerhalb der V_H-Region mukosaler Plasmazellen aus drei *H. pylori*-Patienten

A, Verteilung der SHM innerhalb der V_H-Regionen (FWR1-FWR3) der Plasmazell (PZ)-Subpopulationen jedes Patienten (HP1-3), inklusive der Differenzierung der iNOS⁻ und iNOS⁺ PZ-Subpopulationen innerhalb von HP2 bzw. HP3. Als Orientierungswerte sind die Mutationsraten IgA⁺-PZ aus dem Darm gesunder Probanden (204) als gestrichelte Linie dargestellt. **B**, Mutationsraten innerhalb der V_H-Regionen entsprechend der Differenzierung nach Immunglobulin-Isotypen für alle drei Patienten. Alle Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt. Es wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt (Mann-Whitney Test).

Zusätzlich wurden die Mutationshäufigkeiten getrennt nach den verschiedenen V_H-Familien untersucht (Abb. 5-23). Gensegmente der V_H2-Familie bzw. V_H5-Familie zeigten dabei eine leicht reduzierte Mutationshäufigkeit (Mittelwerte HP1-3: 8,8 % bzw. 10,85 %) im Vergleich zu den anderen V_H-Familien, V_H1-, V_H3- und V_H4-Familien (HP1-3: 12,8 %, 12,5 % bzw. 13,3 %) (Abb. 5-23).

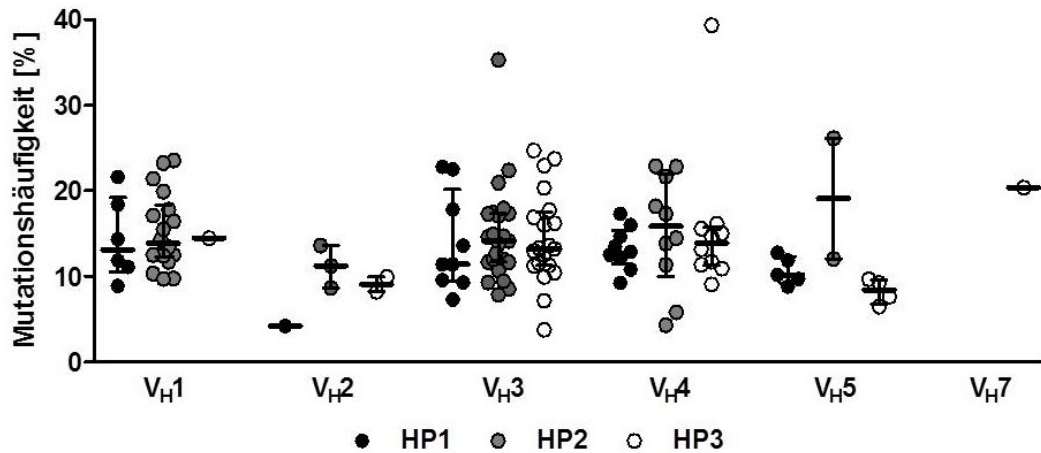


Abbildung 5-23 Somatische Hypermuationen innerhalb der V_H -Region mukosaler Plasmazellen aus drei *H. pylori*-Patienten unterschieden nach V_H -Familien

Verteilung der SHM innerhalb der V_H -Regionen (FWR1-FWR3) der Plasmazellen (PZ) aus drei Patienten (HP1-3), entsprechend der Differenzierung der PZ nach ihrer V_H -Familie. Alle Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt. Es wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt (Mann-Whitney Test).

Als nächstes wurde das Muster der SHM genauer analysiert. Die Antigen-getriebene Selektion der Antigen-bindenden variablen Region der Antikörper beeinflusst im Rahmen der Keimzentrumsreaktion das Muster der SHM. Hier sind von besonderem Interesse die Verhältnisse der Austauschmutationen (*replacement*, R-Mutationen) zu stillen (*silent*) S-Mutationen in den FWR (*framework regions*) und die R/S-Verhältnisse in den CDRH, welche Aufschluss über den zu Grunde liegenden Selektionsprozess geben. Hier wurden mehrere Mutationen, die im selben Triplet lagen und daher zum Austausch von nur einer Aminosäure führten, als eine R-Mutation gezählt. Eine wichtige Eigenschaft der Affinitätsreifung in BZ ist das erhöhte R/S-Verhältnis innerhalb der V_H -Region, d.h., sowohl in den FWR als auch in den CDRH sind mehr R- als S-Mutationen zu finden. Manche Sequenzen zeigten keine S-Mutationen, insbesondere innerhalb der CDRH-Regionen, daher wurde das R/S-Verhältnis der akkumulierten Anzahl der R- und S-Mutationen berechnet. Der intrinsische R/S-Wert der V-Regionen für zufällige, nicht selektionierte Mutationen (wie zum Beispiel in nicht-funktionellen V-Genumlagerungen) nimmt gewöhnlich einen Wert von drei an (191). Um die funktionelle Struktur der Ig zu erhalten, werden R-Mutationen in den FWR im Keimzentrum in der Regel gegenselektiert. Infolgedessen zeigen selektionierte, funktionelle V-Genumlagerungen kleinere R/S-Werte der FWR: der R/S-Wert der FWRs für mBZ liegt gewöhnlich zwischen 1,0 und 1,6 (191). Das Muster von SHM der IgH-Sequenzen passte zu der Hypothese der Antigen-Selektion (205), d.h., die CDRH R/S-Mutationsverhältnisse waren deutlich größer (HP1: 2,7; HP2: 3,3 iNOS⁺ und 3,8 in iNOS⁻ PZ; HP3: 2,8 iNOS⁺ und 3,1 in iNOS⁻ PZ) als die R/S-Verhältnisse von FWR1-3 (HP1: 1,7; HP2: 1,7 iNOS⁺ und 1,4 in

iNOS⁻ PZ; HP3: 2,1 iNOS⁺ und 2,2 in iNOS⁻ PZ) (Tab. 5-1). Die ermittelten R/S-Verhältnisse waren für die drei verschiedenen Patienten bzw. auch für iNOS⁻ und PZ und iNOS⁺ PZ nahezu identisch.

Anschließend wurde das R/S-Verhältnis der FWR- und CDRH-Regionen für die einzelnen Spender getrennt nach Isotypen berechnet (Tabelle 5-2). Hinsichtlich des Isotyps IgA konnten zwischen den PZ der einzelnen Spender keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Lediglich der bereits beobachtete Unterschied der R/S-Verhältnisse zwischen FWR- und CDRH-Regionen wurde bestätigt.

Die Berechnung der R/S-Verhältnisse der IgG-PZ ergab für die Patienten HP1 und HP2 ähnliche Werte für FWR- und CDRH-Regionen; dies ist jedoch vermutlich auf die geringe Anzahl der Sequenzen (je fünf Sequenzen) zurückzuführen.

Tabelle 5-2 R/S-Verhältnisse der FWR- und CDRH-Regionen für die exprimierten IgH-Sequenzen der Plasmazellen der *H. pylori*-Patienten getrennt nach Immunglobulin-Isotypen

Isotyp	Spender	R/S-Werte FWR	R/S-Werte CDRH	Anzahl der Sequenzen
IgA	HP1	1,8	3,0	25
	HP2	1,6	3,3	51
	HP3	2	2,8	33
IgG	HP1	1,4	1,8	5
	HP2	1,8	3,4	6
	HP3	3	2,9	5

5.2.4. Ähnliche Verteilung der CDRH3-Längen in iNOS⁺ und iNOS⁻ Plasmazellen

Als nächstes wurden die IgH-Sequenzen der mukosalen PZ *H. pylori*-infizierter Patienten hinsichtlich ihrer CDRH3-Längen untersucht (Abb. 5-24), da für antigen-spezifische Antikörper-Antworten gezeigt wurde, dass ihre CDRH3-Loops auf eine bestimmte Länge selektiert werden (206-208). Darüber hinaus erlaubt die CDRH3 Region eine erste Einschätzung der Klonalität der Immunantwort.

Die Anzahl der Basenpaare, welche die CDRH3-Region bildeten, variierte erheblich (HP1: 30-87bp; HP2: 27-69bp; HP3: 18-69bp; Abb. 5-24A). Diese Variation der CDRH3-Längen ist indikativ für eine relativ uneingeschränkte Antwort. Dennoch konnten Spender-spezifische Akkumulationen von bestimmten Längen identifiziert werden, welche teilweise aus klonal verwandten Zellen hervorgegangen sind (s. 5.2.5. Klonalität). Die durchschnittliche CDRH3-Längen der einzelnen Spender und der PZ-Subpopulationen lagen bei 45-49,5bp (HP1: 45bp; HP2: 48bp iNOS⁺ PZ und iNOS⁻ PZ; HP3: 49,5bp iNOS⁺ PZ und 46,5bp iNOS⁻ PZ, $P > 0,05$, Mann-Whitney-Test). Interessant ist jedoch, dass die hier untersuchten PZ-

Repertoires alle eine deutlich größere CDRH3-Länge aufwiesen als der durchschnittliche Kontrollwert IgA⁺-PZ aus dem Darm eines gesunden Spenders, welcher bei 38,4bp lag (204). Die Untersuchung der CDRH3-Längen der drei HP-Patienten getrennt nach den Ig-Isotypen betrachtet zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Abb. 5-24B).

Zusammenfassend ergab die Analyse der CDRH3-Längen, dass sich diese zwischen den Subpopulationen, d.h. zwischen iNOS⁺ und iNOS⁻ PZ sowie den Isotypen IgA1, IgA2 und IgG nicht signifikant unterschieden. Es waren jedoch längere CDRH3-Längen nachweisbar als die, welche für PZ aus dem Darm gesunder Spender beschrieben worden waren.

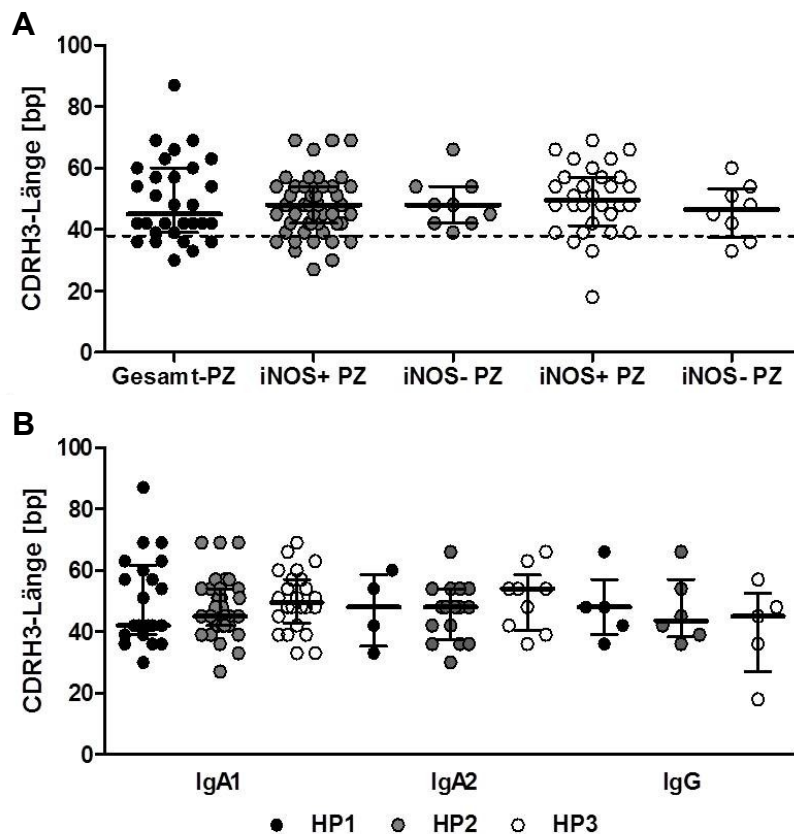


Abbildung 5-24 CDRH3 Sequenzlänge mukosaler Plasmazellen aus drei *H. pylori*-Patienten

Verteilung der CDRH3-Längen in Basenpaaren (bp) der Plasmazell (PZ)-Subpopulationen jedes Spenders. **A**, CDRH3-Längen der drei Patienten (HP1-3) inklusive der Differenzierung der iNOS⁻ und iNOS⁺ PZ-Subpopulationen innerhalb von HP2 bzw. HP3. Als Orientierungswerte sind die Anteile der CDRH3-Längen der IgA⁺-PZ aus dem Darm gesunder Probanden (204) als gestrichelte Linie dargestellt. **B**, CDRH3-Längen für die Patienten (HP1-3) inklusive der Differenzierung nach Immunglobulin-Isotypen. Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt. Es wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt (Mann-Whitney Test).

5.2.5. Klonalität

Da die Verteilung der CDRH3-Längen der mukosalen PZ der *H. pylori*-Patienten oligoklonale Repertoires aufzeigte (Abb. 5-24), wurden die IgH-Sequenzen weiter hinsichtlich ihrer

klonalen Verwandtschaft untersucht. Ein Klon wurde definiert über seine einzigartige IgH-Sequenz der variablen Region, also auch der CDRH-Länge und Sequenz (209).

Um klonal verwandte Zellen identifizieren zu können, wurden alle ermittelten V_HDJ_H-Rekombinationen sowie dazugehörige CDRH3-Längen eines Spenders miteinander verglichen. Es konnten für zwei der drei *H. pylori*-Patienten Zellen identifiziert werden, die in ihrer V_HDJ_H-Rekombination und CDRH3-Länge identisch waren. Für Spender HP1 wurden zwei Paar klonal verwandte von 30 analysierten PZ-Sequenzen gefunden, für Spender HP2 waren es drei Paar von 56 Sequenzen und für Spender HP3 wurden keine klonal verwandten Zellen gefunden. Die klonal verwandten Zellen waren alle dem Isotypen IgA1 zuzuordnen und die gesamten klonal verwandten Zellen von Spender HP2 waren iNOS⁺ PZ. Hinsichtlich ihrer Mutationen unterschieden sich jedoch jeweils die beiden klonal verwandten Zellen. Jede der Zellen wies Mutationen auf, die in der anderen Zelle nicht auftraten. Tabelle 5-3 zeigt die Eigenschaften der klonal verwandten PZ im Überblick.

Tabelle 5-3 Molekulare Eigenschaften der klonal verwandten Plasmazellen (PZ) von *H. pylori*-Patienten

Spender	PZ-Population	V _H -Segment	D-Segment	J _H -Familie	CDRH3-		Anzahl an Mutationen	R/S-Werte FWR	R/S-Werte CDRH
					Länge [bp]	Isotyp			
HP1	Gesamt-PZ	4-31	7-27	6	51	IgA1	38	1,4	3
	Gesamt-PZ	4-31	7-27	6	51	IgA1	32	1	5
	Gesamt-PZ	5-51	3-10	4	36	IgA1	19	8	3
	Gesamt-PZ	5-51	3-10	4	36	IgA1	22	4,5	3
HP2	iNOS pos	3-23	2-21	4	51	IgA1	38	1	3,7
	iNOS pos	3-23	2-21	4	51	IgA1	32	2,8	9
	iNOS pos	3-23	3-22	4	57	IgA1	34	1,4	2,3
	iNOS pos	3-23	3-22	4	57	IgA1	37	0,8	3,5
	iNOS pos	3-48	6-19	6	57	IgA1	73	3,5	4,3
	iNOS pos	3-48	6-19	6	57	IgA1	14	1,5	1

Zusammenfassend zeigten die Antikörper der analysierten mukosalen iNOS⁻ und iNOS⁺ PZ-Subpopulationen ähnliche Eigenschaften ihrer Ig-Gene und wurden einer Antigen-getriebenen klonalen Expansion und Diversifikation unterzogen, waren jedoch bis auf einige wenige Ausnahmen nicht klonal verwandt.

5.3. Generierung rekombinanter Antikörper einzelner mukosaler Plasmazellen im Kontext einer chronischen *H. pylori*-Infektion

Die molekularbiologische Charakterisierung der Antikörpersequenz alleine ermöglicht keine Vorhersage der Reaktivität bzw. Spezifität dieser Antikörper. Um diese Einschränkung zu überwinden, wurden Antikörper einzelner humaner PZ definierten Ursprungs kloniert und exprimiert (187). Die rekombinanten Antikörper können dabei in einem größerem Maßstab generiert werden, um sie in verschiedenen Verfahren zu testen (178, 187).

5.3.1. Klonierung der variablen Regionen der leichten und schweren Antikörperketten

Um das Antikörper-Repertoire und die Spezifität humaner mukosaler PZ im Kontext einer chronischen *H. pylori*-Infektion zu untersuchen, wurden aus dem Patienten HP2 rekombinante monoklonale Antikörper sowohl aus iNOS⁻ und iNOS⁺ PZ als auch IgA⁺ und IgG⁺ PZ kloniert, exprimiert und ihre Reaktivität gemessen. Wie unter 5.2.3. beschrieben wiesen alle Antikörper eine hohe Anzahl somatischer Mutationen auf und zeigten Zeichen einer starken Antigen-getriebenen Selektion.

Diese Strategie baut methodisch auf die molekularbiologische Charakterisierung der Antikörper der mukosalen PZ auf (Kap. 5.2). Zusätzlich zu den bereits amplifizierten und analysierten variablen Regionen der IgH-Ketten wurden mittels der bereits generierten cDNA aller aus Patient HP2 isolierten PZ ebenfalls die variablen Regionen der leichten Ketten amplifiziert und die Sequenzen hinsichtlich der spezifischen V und J Genkombination analysiert. Anschließend wurden alle erfolgreich sequenzierten Paare von schwerer und leichter Kette basierend auf der Sequenzinformation mittels spezifischer Primer amplifiziert, welche Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in die entsprechenden Vektoren enthielten (Abb. 5-25). Alle PCR-Produkte wurden nach ihrer Klonierung erneut sequenziert, um die Übereinstimmung mit der Original-Sequenz sicher zu stellen und Klone von der Analyse auszuschließen, die von der Taq-Polymerase eingeführte Mutationen enthielten.

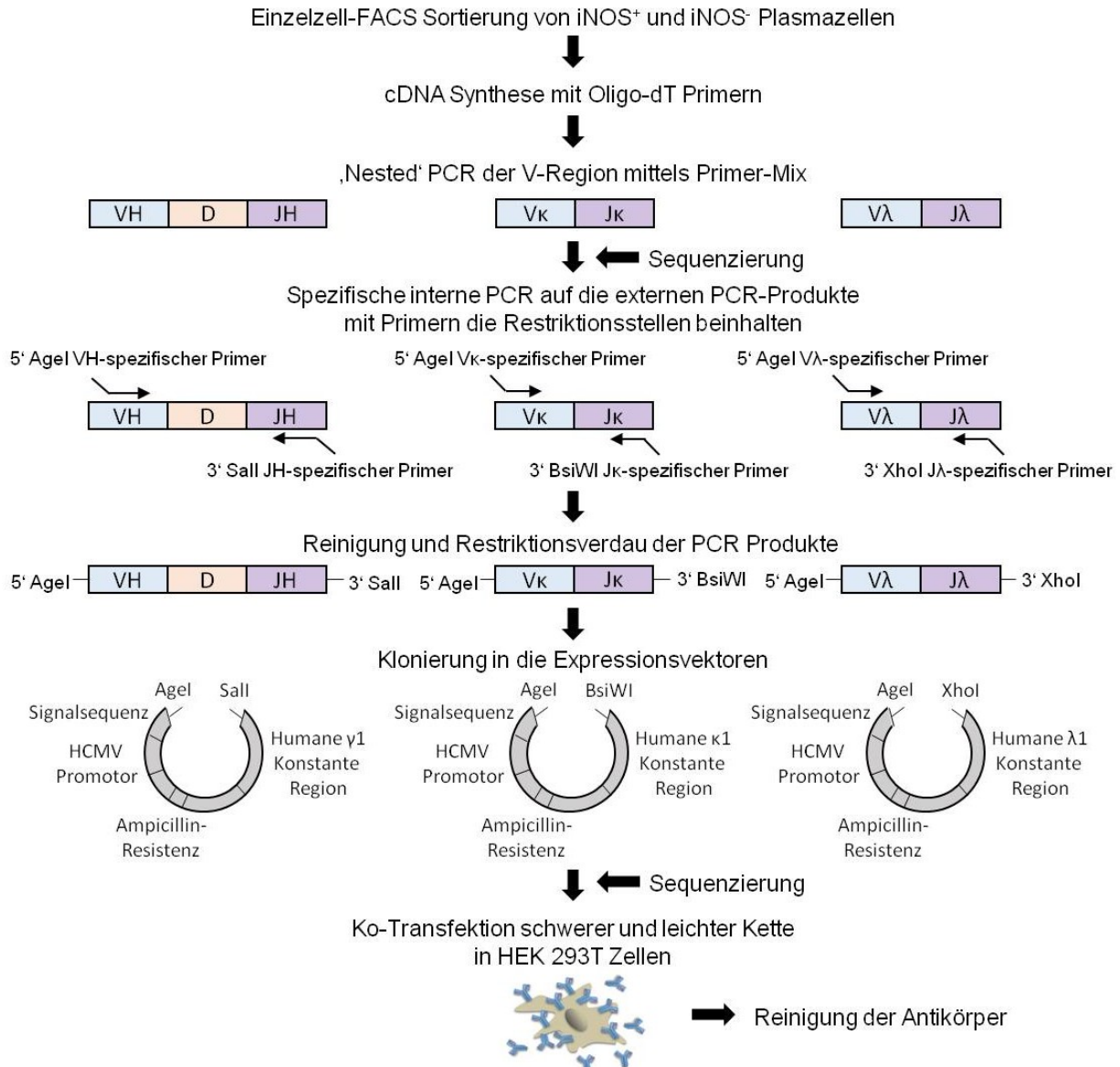


Abbildung 5-25 Strategie zur Klonierung und Expression humaner monoklonaler Antikörper

IgH- und IgL-Ketten Gene wurden mittels 'nested' PCR aus Einzelzell-cDNA amplifiziert, bevor diese in eukaryotische Expressionsvektoren ligiert wurden. Die erste PCR erfolgte mit einem Mix aus Vorwärtsprimern spezifisch für die Leaderregion und Rückwärtsprimern spezifisch für die jeweilige konstante Region von IgH, Igκ oder Igλ. Die zweite PCR erfolgte mit einem Mix aus Vorwärtsprimern spezifisch für FWR1 und der dazugehörigen 'nested' Rückwärtsprimer spezifisch für IgH, Igκ und Igλ J-Gene oder konstante Region.

Um die Einführung von AA-Austausche durch die Nutzung von Primermixen zu verhindern, wurde das PCR-Produkt der zweiten PCR sequenziert, um die V- und J-Gene zu bestimmen. Dadurch war es möglich, V-Gen und J-Gen-spezifische Primer zu verwenden, die eine Schnittstelle enthielten und eine spezifische zweite PCR Runde durchzuführen mit dem ersten PCR-Produkt als Template. Alle PCR-Produkte wurden vor und nach der Klonierung in den Expressionsvektor sequenziert. Für die rekombinante Antikörperproduktion wurden ausschließlich Plasmide in die HEK293T-Zellen ko-transfiziert, deren Inserts zu 100 % identisch mit dem ursprünglichen PCR-Produkt waren. Die Antikörper wurden schließlich nach Kultivierung aus dem Überstand mittels ProteinG-Sepharose gereinigt.

Die elektrophoretische Analyse der PCR-Produkte der kappa- bzw. lambda-spezifischen Amplifikationen der variablen Region ergab, bezogen auf die Analyse aller PZ-Subpopulationen, dass von den 77 generierten Amplifikaten 53 Igκ und 24 Igλ waren und entsprach damit dem Durchschnittswert von 60 % Igκ und 40 % Igλ exprimierenden BZ im Menschen (187). In sechs Fällen wurden die Gene der variablen Region beider leichten Ketten, Igκ und Igλ, amplifiziert. Dieses Phänomen wurde bereits von Wardemann et al. beschrieben (187). Die PZ, die die Gene beider leichten Ketten exprimierten, gingen nicht in die weitere Analyse ein. Von den insgesamt 47 Amplifikaten der IgL-Ketten, bei denen bereits ein sequenziertes Produkt der dazugehörigen IgH-Kette vorlag, konnten 40 (10 Igλ und 30 Igκ) erfolgreich sequenziert werden. Die spezifische PCR dieser Gene ergab neun lambda- und 23 kappa-Amplifikate. Die spezifische PCR der 40 dazugehörigen schweren Ketten ergab 22 erfolgreiche Amplifikate. Dadurch ergaben sich schließlich 17 Paare von Amplifikaten, die anschließend in die entsprechenden Vektoren kloniert werden konnten. Diese Paare setzten sich aus 13 iNOS⁺ und 4 iNOS⁻ PZ zusammen. Nach erfolgreicher Klonierung und Identifizierung der Klone mit identischer Sequenz zur Ursprungssequenz ergaben sich 14 Vektoren-Paare, welche sich aus den variablen Regionen der Antikörper der 11 iNOS⁺ und 3 iNOS⁻ PZ zusammensetzten. Die Eigenschaften dieser erfolgreich klonierten Sequenzen sind in Tabelle 5-4 zusammengefasst.

5.3.2. Transfektion eukaryotischer Zellen und Reinigung der rekombinanten Antikörper

Für die rekombinante Antikörperproduktion wurden IgH-Ketten- und dazugehörige IgL-Ketten-kodierende Plasmide mittels SuperFect® Transfektionsreagenz in HEK-293T Zellen kotransfiziert. Nach 7-tägigem Wachstum wurden aus dem Kulturüberstand der Zellen mittels ProteinG-Sepharose die rekombinanten Antikörper gereinigt und konzentriert. Anschließend wurden IgG-ELISAs zur Bestimmung der IgG-Konzentrationen durchgeführt, wobei humanes IgG als Standard diente. Die ermittelten Konzentrationen der einzelnen rekombinanten Antikörper sind in Abbildung 5-26 dargestellt. Die IgG-Konzentrationen variierten zwischen 0,1 bis 83,3 µg/ml. Die höchsten IgG-Konzentrationen enthielten die Proben 8C mit 83,3 µg/ml und 6H mit 77,8 µg/ml und die niedrigsten Konzentrationen die Proben 8A mit 2,5 µg/ml und 10D mit 3,1 µg/ml. In der Probe 12D waren keine Ig nachweisbar; diese wurde daher von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Tabelle 5-4 Molekulare Eigenschaften der erfolgreich klonierten variablen Regionen der Antikörper aus Plasmazellen (PZ) des Patienten HP2.

Name	Isotyp	Kette	PZ- Population	V- Segment	D- Segment	J- Familie	CDR3- Länge [bp]	Anz. an Mutationen	Länge der V-Region [bp]	Mutations- häufigkeit [%]
3E	IgA2	Igκ	iNOS pos	1-33		4	27	26	204	12,75
		IgH	iNOS pos	3-23	3-22	4	66	34	231	14,72
4A	IgA1	Igλ	iNOS pos	6-57		2	27	31	222	13,96
		IgH	iNOS pos	3-23	3-22	4	69	51	228	22,37
5A	IgA1	Igλ	iNOS pos	1-44		3	36	34	216	15,74
		IgH	iNOS pos	1-02	1-1	4	39	29	216	13,43
5C	IgA1	Igκ	iNOS pos	4-1		5	27	14	219	6,39
		IgH	iNOS pos	1-69	2/OR15-2	3	45	21	216	9,72
6A	IgA2	Igκ	iNOS pos	3-20		4	27	15	210	7,14
		IgH	iNOS pos	1-69	3-16	3	54	31	216	14,35
6G	IgG3	Igλ	iNOS pos	3-21		3	39	4	204	1,96
		IgH	iNOS pos	4-30-4	IR2	4	36	10	231	4,33
6H	IgA1	Igκ	iNOS pos	3-20		2	30	19	210	9,05
		IgH	iNOS pos	4-28	3-16	6	42	22	159	13,84
8A	IgA2	Igκ	iNOS pos	1-5		2	27	22	207	10,63
		IgH	iNOS pos	5-51	IR	5	36	26	216	12,04
8C	IgA1	Igλ	iNOS pos	3-21		2	33	13	213	6,1
		IgH	iNOS pos	3-15	3-22	4	45	27	231	11,69
8F	IgA1	Igλ	iNOS pos	1-40		2	30	19	219	8,68
		IgH	iNOS pos	3-72	2-15	6	54	21	225	9,33
9C	IgA2	Igκ	iNOS pos	3-15		2	27	12	213	5,63
		IgH	iNOS pos	3-53	6-25	3	42	21	222	9,46
9F	IgA1	Igκ	iNOS pos	1D-39		4	27	8	201	3,98
		IgH	iNOS pos	3-07	1-26	4	42	19	222	8,56
10B	IgG3	Igκ	iNOS neg	3-15		2	30	14	171	8,19
		IgH	iNOS neg	1-69	4-11	6	45	34	219	15,53
10D	IgA2	Igκ	iNOS neg	1-39		2	27	17	210	8,1
		IgH	iNOS neg	3-09	6-19	6	48	18	228	7,89
12D	IgA1	Igκ	iNOS neg	3-15		2	33	11	207	5,31
		IgH	iNOS neg	1-69	1-26	3	42	28	225	12,44

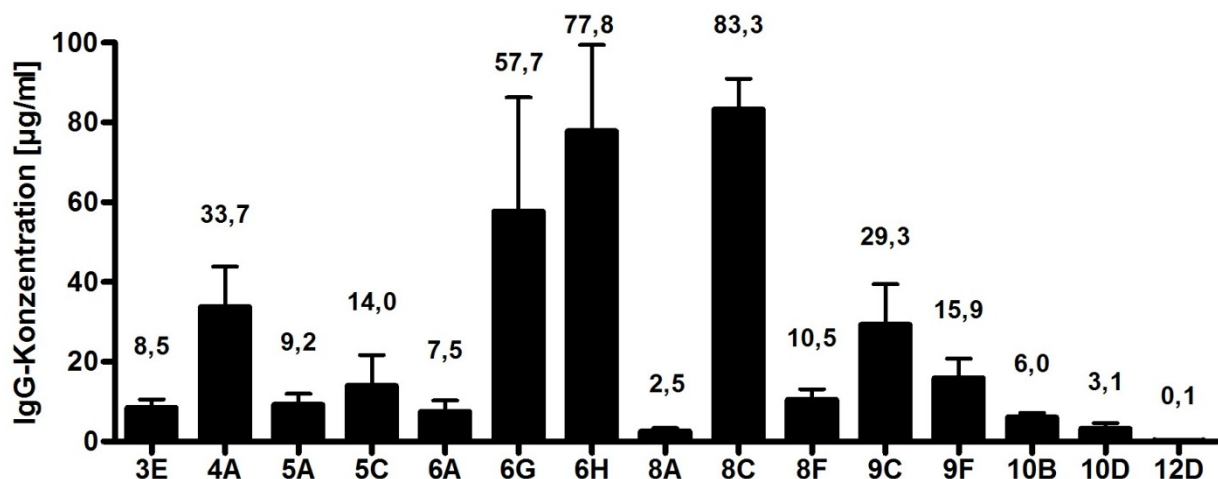


Abbildung 5-26 IgG-Konzentrationen der gereinigten rekombinanten Antikörper einzelner mukosaler Plasmazellen von *H. pylori*-Patient HP2

Bestimmung der IgG-Konzentration mittels ELISA und Standardreihe aus humanem IgG. Werte sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

Die funktionelle Ig-Produktion wurde anschließend mittels denaturierender SDS-Gelelektrophorese getestet. Bei allen Proben, außer 8A und 10D, konnte eine funktionelle Ig-Produktion gezeigt werden, da beide Untereinheiten exprimiert wurden. Bei 8A und 10D konnten, vermutlich aufgrund der zu niedrigen Proteinmenge (0,25 bzw. 0,3 µg), keine Banden sichtbar gemacht werden.

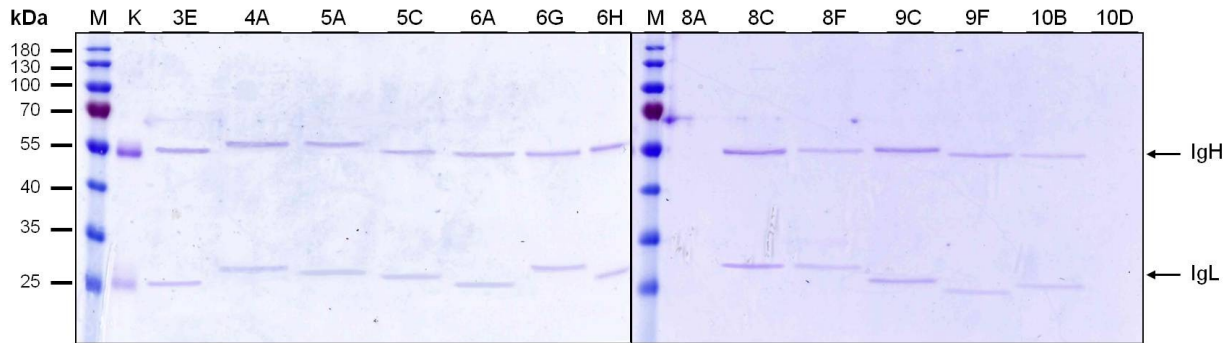


Abbildung 5-27 SDS-Gel gereinigter rekombinanter monoklonaler humaner Antikörper unter denaturierenden Bedingungen

Für die Denaturierung wurden 5 % β -Mercaptoethanol zum Proteinladepuffer zugegeben und die Proben wurden für 10 min bei 95°C inkubiert. Circa 0,75 µg des Proteins wurden auf 12 % Standard-SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Von Probe 8A und 10B wurden aufgrund der Konzentration nur 0,25 µg bzw. 0,3 µg aufgetragen. Proteinbanden wurden mittels Coomassie-Färbung visualisiert. K: Kontrolle, humanes Serum IgG1. M: Proteinmarker.

5.3.3. Reaktivität der rekombinanten Antikörper mit *H. pylori* Antigenen

Um die Reaktivität der Antikörper aus humanen mukosalen iNOS⁻ und iNOS⁺ PZ eines *H. pylori*-Patienten zu untersuchen, wurden die rekombinanten monoklonalen Antikörper sowohl mittels ELISA als auch Western-Blot untersucht. Mithilfe des ELISA war es möglich die Reaktivität der Antikörper mit den gesamten löslichen *H. pylori* Antigenen als auch mit den unlöslichen Bestandteile zu messen, da die ELISA-Platten mit dem Lysat-Überstand bzw. Gesamtlysate von *H. pylori* P12 wt beschichtet wurden (Abb. 5-28).

Es zeigte sich, dass der rekombinante Antikörper 6A spezifisch *H. pylori* Antigene gebunden hat. Dies zeigte sich auch darin, dass unabhängig von der Konzentration des eingesetzten Antikörpers eine ähnliche OD_{620nm} gemessen wurde (Lysat-Überstand: 0,673 und 0,68; Lysat: 0,629 und 0,623). Alle weiteren getesteten Antikörper zeigten OD-Werte unterhalb der Negativkontrolle (OD_{620nm} > 0,24) und zeigten zudem konzentrationsabhängige Unterschiede, die zusätzlich eine unspezifische Reaktion auf die Antigene indizieren. Die Reaktivitäten des Antikörpers 6A gegen Antigene des Lysat-Überstandes unterschieden sich nicht von denen im Gesamtlysate und daher ist anzunehmen, dass das Antigen, gegen die der Antikörper reagiert hat, unter den löslichen Bestandteilen zu finden war.

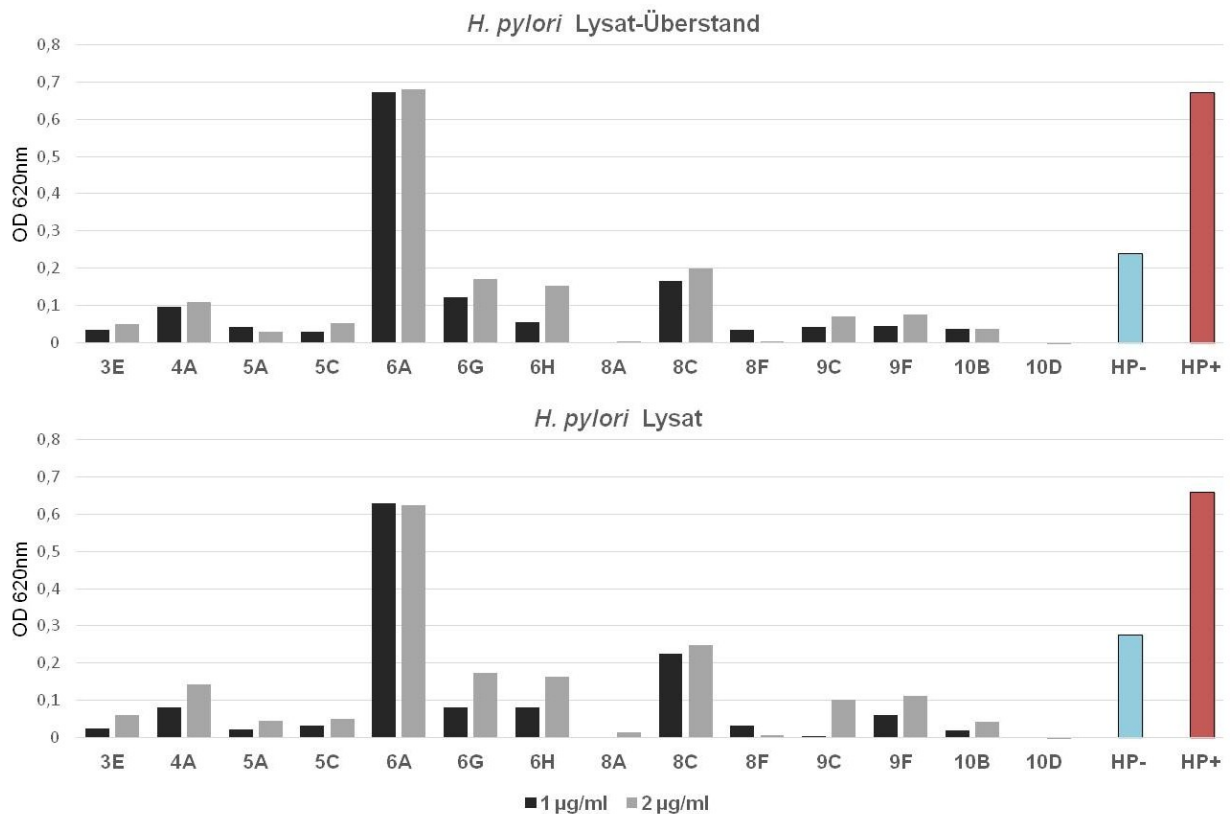


Abbildung 5-28 Detektierung *H. pylori*-spezifischer Antikörper mittels ELISA

Reaktivitätsprofile der rekombinanten monoklonalen Antikörper aus einem *H. pylori*-Patienten getestet mittels ELISA mit Überstand des Bakterienlysates (oben) bzw. dem Gesamtlysate von *H. pylori* P12 wt. Untersucht wurden je 1 µg/ml (schwarz) und 2 µg/ml (grau) der Antikörper. Als Positiv- (HP+) und Negativkontrolle (HP-) dienten Serum-Antikörper des ELISA-Kits RIDASCREEN® Helicobacter IgG.

Neben dem ELISA wurden die Antikörper mittels Western-Blot charakterisiert. Mithilfe des *recomLine* Helicobacter IgG Kits wurden die rekombinanten Antikörper auf die Bindespezifität definierter *H. pylori*-Proteine getestet. Die zu testenden Antigene in dem Kit waren die sechs immunogenen, sezernierten Virulenzfaktoren CagA, VacA, GroEL, UreA, HcpC und gGT (Abb. 5-29).

Hiermit ließ sich in zwei unabhängigen Experimenten für den rekombinanten Antikörper 5C eine Bindespezifität für das *H. pylori* Antigen VacA nachweisen (Abb. 5-29).

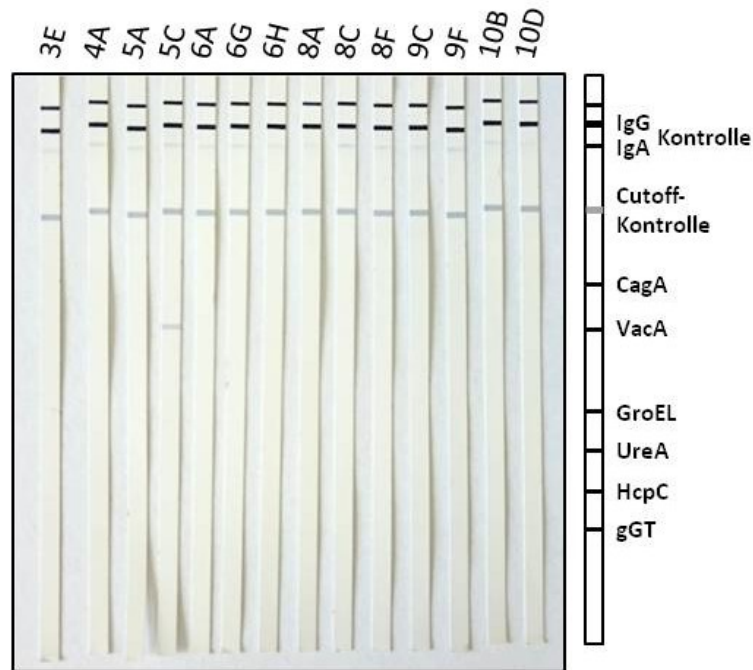


Abbildung 5-29 Detektierung *H. pylori*-spezifischer Antikörper mittels Western-Blot

Bindespezifität der rekombinanten monoklonalen Antikörper aus einem *H. pylori*-Patienten getestet mittels Western-Blot-Analyse auf Teststreifen des *recomLine* Helicobacter IgG Kits. Auf den Teststreifen befanden sich Kontrollen (IgG und IgA Kontrollen und eine Cutoff-Kontrolle) sowie die zu testenden *H. pylori* Antigene CagA, VacA, GroEL, UreA, HcpC und gGT. Untersucht wurden in zwei unabhängigen Experimenten je 1 ml einer 1,5 µg/ml Antikörperlösung, verdünnt im Probenpuffer schwenkend inkubiert über Nacht bei 4°C.

Zusammenfassend konnte für zwei von 13 getesteten rekombinanten Antikörpern eine Reaktivität für *H. pylori*-Antigene gezeigt werden. Beide Antikörper stammten aus iNOS⁺ PZ (Tab. 5-4). Der Antikörper 6A bindet ein noch unbekanntes, natives lösliches Antigen, und der Antikörper hatte ursprünglich den Isotyp IgA2. Der Antikörper 5C bindet das denaturierte Protein VacA, und der Antikörper hatte ursprünglich den Isotyp IgA1. Beide Antikörper nutzen die Segmente V_H1-69 in Verbindung mit J_H3 und haben mit 216 bp die gleiche Länge der V-Region. Weiterhin nutzten beide Antikörper als leichte Kette die kappa-Kette.

5.3.4. Polyreaktivität der rekombinanten Antikörper

Polyreaktive Antikörper gelten als wesentlicher Beitrag zum intestinalen Antikörper-Repertoire und zur Vermittlung regulatorischer Funktionen durch Immunausschluss luminalener Antigene (210, 211). Die Polyreaktivität der rekombinanten Antikörper wurde mittels ELISAs untersucht, die die Reaktivität mit strukturell unterschiedlichen Antigenen wie LPS, dsDNA und ssDNA messen (178, 187). Die Analyse zeigte für LPS, dsDNA und ssDNA ein ähnliches Reaktionsprofil der getesteten Antikörper (Abb. 5-30). Die Profile zeigten, dass v.a. die rekombinanten Antikörper 4A, 6G sowie 3E und 5A eine Reaktivität

gegen LPS, dsDNA und ssDNA zeigten. Außerdem zeigte der Antikörper 6H eine Reaktivität für LPS und dsDNA.

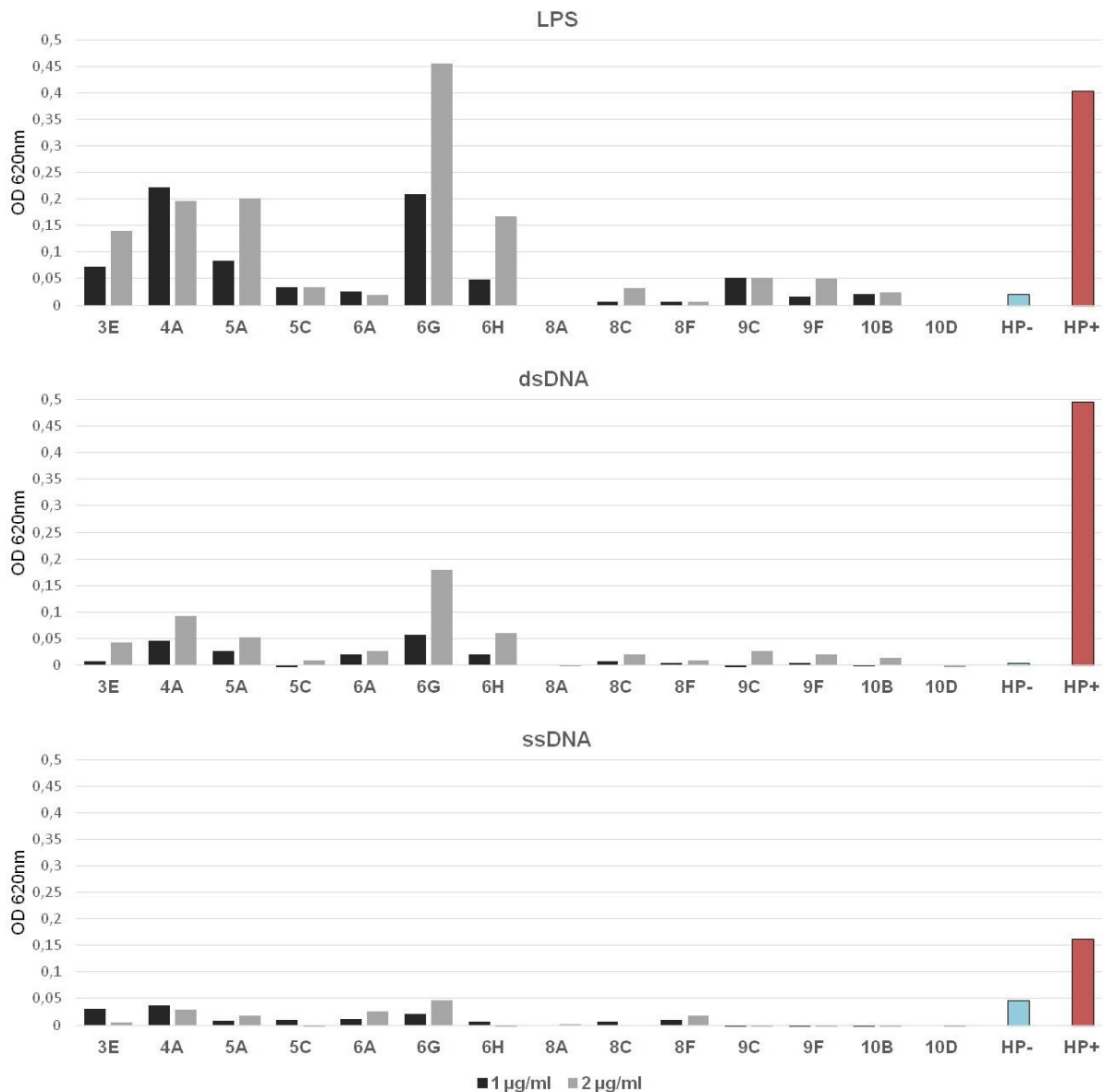


Abbildung 5-30 Detektierung polyreaktiver Antikörper mittels ELISA

Reaktivitätsprofile der rekombinanten monoklonalen Antikörper aus einem *H. pylori*-Patienten getestet mittels ELISA mit LPS (oben), dsDNA (mitte) bzw. ssDNA (unten). Untersucht wurden je 1 µg/ml (schwarz) und 2 µg/ml (grau) der Antikörper. Als Vergleichswerte dienen die Positiv- (HP+) und Negativkontrolle (HP-) des ELISA-Kits RIDASCREEN® Helicobacter IgG.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass fünf der getesteten Antikörper polyreaktiv sind, d.h. mindestens zwei der drei getesteten Antigene binden konnten. Alle polyreaktiven Antikörper waren von iNOS-exprimierenden PZ (Tab. 5-4). Außerdem waren die Antikörper 4A, 5A und 6H ursprünglich Antikörper des Isotyps IgA1, 3E war ursprünglich IgA2 und 6G war IgG3. Vier der fünf polyreaktiven Antikörper, d.h. 3E, 4A, 5A und 6G, zeigten die Nutzung des J_H4-Segmentes, und 3E sowie 4A in Kombination mit V_H3-23.

6. DISKUSSION

Infolge einer Infektion mit *H. pylori* entwickelt sich eine mukosale Immunantwort, die vom Einstrom von Neutrophilen, Makrophagen, Dendritischen Zellen und Lymphozyten sowie dem Aufbau organisierter lymphoider Strukturen gekennzeichnet ist (71). Trotz der ausgeprägten Immunantwort ist *H. pylori* in den meisten Fällen in der Lage für Jahrzehnte im menschlichen Magen zu persistieren. Dieses kann durch die chronisch aktive Immunantwort zu schweren Folgeerkrankungen wie Magengeschwür, Magenkarzinom oder MALT-Lymphom führen. Die iNOS-abhängige Produktion von NO ist einer der Faktoren, die sowohl zur antimikrobiellen Immunität (111) als auch zur Pathologie beitragen können (128). Infolge einer *H. pylori*-Infektion kommt es zu einer Hochregulation von iNOS im mukosalen Gewebe (109, 110), aber bisher waren die zellulären Quellen von iNOS und ihre Funktionalität nicht ausreichend geklärt.

Diese Arbeit hatte das Ziel, die kurz zuvor in der Arbeitsgruppe erstmals immunhistochemisch identifizierten iNOS⁺ MUM1⁺ PZ genauer zu charakterisieren und die zu Grunde liegende Funktionalität und Bedeutung dieses PZ-Phänotyps in Menschen während einer *H. pylori*-Infektion zu untersuchen. Das Wissen hierüber ist nicht nur für das Verständnis der Immunantwort gegen die Infektion wichtig, sondern auch für zukünftige Impfstoffstudien. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde im ersten Teil eine phänotypische Charakterisierung von BZ und PZ im Kontext einer chronischen *H. pylori*-Infektion durchgeführt, welche die Verteilung der Zellen als auch die Messung der Antikörper- und Zytokin-Level beinhaltete. Im zweiten Teil wurde eine molekularbiologische Analyse des exprimierten variablen und konstanten IgH-Sequenzrepertoires mukosaler PZ von *H. pylori*-Patienten durchgeführt, mit einem besonderen Fokus auf dem Vergleich iNOS⁺ und iNOS⁻ PZ. Die Daten erlauben Einblicke in die Komposition und Diversität des spezifischen PZ-Repertoires während einer *H. pylori*-Infektion. Außerdem wurden die Spezifitäten der analysierten Ig-Repertoires charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden rekombinante monoklonale Antikörper sowohl aus iNOS⁻ als auch iNOS⁺ PZ kloniert, exprimiert und schließlich die Reaktivität gemessen.

6.1. Phänotypische Charakterisierung der B-Zellen und Plasmazellen im Kontext einer chronischen *H. pylori*-Infektion

In dieser Arbeit wurde eine starke Akkumulation CD19⁺ BZ in der *H. pylori*-infizierten Magenmukosa nachgewiesen. Eine erhöhte BZ- und PZ- Aktivierung spiegelt sich in den hier im Vergleich zu Kontrollen gemessenen erhöhten mukosalen IgA-Konzentrationen und dem

Nachweis *H. pylori*-spezifischer IgG wider. Interessanterweise wurden PZ durchflusszytometrisch als eine der wesentlichen Zellpopulationen identifiziert, die zu 70 % enzymatisch aktive iNOS in der Magenmukosa *H. pylori*-infizierter Patienten exprimieren. Im Unterschied dazu enthielten die LPL gesunder Kontrollen keine oder fast keine CD19⁺ BZ oder PZ, in Übereinstimmung mit vorherigen Studien (98, 190). Dies ist der erste Nachweis der iNOS-Expression in nicht entarteten, humanen BZ-Populationen, d.h., IgA-sezernierende PZ. Die Expression dieses Enzyms in humanen PZ scheint eine Besonderheit der *H. pylori*-Infektion zu sein, da mukosale iNOS⁺ PZ nicht in duodenalen Biopsaten von *T. whipplei*-, HIV- oder *G. duodenalis*-infizierten Patienten detektiert wurden, und auch iNOS-negative mukosale PZ in *H. pylori*-infizierten Patienten nachgewiesen wurden. Dementsprechend ergab auch die Analyse von Transkriptom-Daten gereinigter zirkulierender PZ von Patienten mit systemischen Lupus erythematosus, einer Autoimmunerkrankung gekennzeichnet durch eine distinkte Typ 1 Interferon-Antwort, keinen Nachweis einer iNOS-Expression (unveröffentlichte Daten, J. Gruen, T. Dörner et al.). Bis heute ist die iNOS-Expression in humanen BZ-Populationen nur in gastrischen MALT Lymphom-Zellen (135), *chronischen* lymphatischen leukämischen BZ (171) oder konstitutiv und in einer niedrigen Konzentration in EBV-transformierten humanen B-Lymphozyten (B-LZL)(197) beschrieben, aber die induzierenden Faktoren blieben unbekannt. Die Induktion der iNOS-Expression zeigt sehr ausgeprägte und komplexe Spezies- und Zelltyp-spezifische Unterschiede, da die Expression auf transkriptioneller, translationaler und post-translationaler Ebene reguliert wird (175, 212-214). In der humanen Lungenepithel-Zelllinie A549 wurde gezeigt, dass funktionelle AP-1- und NF-κB-bindende Elemente in der Promoter-Region eine TNF-α, IL-1 und IFN-γ Zytokin-Induzierbarkeit verleihen (215). Zusätzlich ist in der Literatur beschrieben, dass das Zytokin IFN-γ die Expression des Enzyms iNOS in Makrophagen hochreguliert (116).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die iNOS-Expression in B-LZL Zellen, die PZ-Markerproteine, wie den Aktivierungsmarker CD38 exprimieren, mit einer prominenten Produktion von IFN-γ einhergeht. IFN-γ oder TNF-α können die Transkription des humanen iNOS-Gens über den Signalweg des Transkriptionsfaktors NF-κB induzieren (216). Daher regulieren möglicherweise Zytokine NF-κB-abhängig die iNOS-Expression in BZ-Populationen in einer auto-/parakrinen Weise. Tatsächlich zeigen die Daten von mBZ und PZ, isoliert von der Magenschleimhaut von einem *H. pylori*-infiziertem Patienten, in Übereinstimmung mit dieser Hypothese, nur in der iNOS⁺ Subpopulation auch IFN-γ und TNF-α bzw. TNF-α Signale bei der durchflusszytometrischen Analyse. Hypothetisch könnte

die kombinierte lokale Präsenz von IFN- γ und TNF- α in Verbindung mit Signalen, die von *H. pylori* induziert werden, die iNOS-Expression in PZ aufrechterhalten.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei einer *H. pylori*-Infektion mukosale mBZ ein höheres IFN- γ und TNF- α mRNA-Level zeigen als periphere mBZ. Die Induktion der Expression proinflammatorischer Zytokine in BZ-Populationen in der infizierten Magenschleimhaut könnte das Resultat der erhöhten IL-12 Expression und der dadurch geförderten Aktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet sein (217). Zusätzlich stellt IL-12 möglicherweise selbst ein lokales Signal für die IFN- γ Produktion von BZ dar. BZ, die in der Anwesenheit von IL-12 aktiviert werden, können IFN- γ produzieren, und das führt möglicherweise zu einer positiven Feedback-Schleife, kontrolliert durch den IFN- γ Rezeptor und T-bet, welche BZ zu einer persistierenden IFN- γ Sekretion stimulieren, wie es für murine BZ gezeigt wurde (218). BZ und PZ sind demnach in der Lage, die Bekämpfung von Pathogenen auch Antikörper-unabhängig, mithilfe der Produktion von Zytokinen, zu unterstützen. Die Zytokin-Produktion einiger BZ-Populationen kann sowohl die Entwicklung von lymphatischem Gewebe sowie die Effektor- und *memory* CD4⁺ T-Zellantworten positiv beeinflussen als auch die Immunantwort regulieren (219). Interessanterweise scheint die IFN- γ Produktion durch follikuläre BZ eine wichtige Rolle bei dem Aufbau von Lymphfollikeln in der humanen Magenschleimhaut nach einer *Helicobacter suis* Infektion zu spielen (220). Möglicherweise beeinflussen demnach iNOS⁺ BZ bzw. PZ durch die Produktion von IFN- γ und/oder TNF- α auch die Bekämpfung einer *H. pylori*-Infektion positiv, eventuell durch die Unterstützung der Th1-vermittelten Immunantwort, die in einigen *H. pylori*-infizierten Individuen vor der chronischen Infektion schützt (10).

Die iNOS-Expression in mukosalen PZ während einer *H. pylori*-Infektion ist wahrscheinlich das Ergebnis von Signalen an die PZ oder deren Vorläuferzellen im spezifischen Verlauf dieser Infektion. Die Aufdeckung der Identität dieser Signale erfordert weitere Studien, könnte aber die fehlende Verbindung zum Verständnis der erfolgreichen Pathogenbekämpfung liefern.

Neben der Frage, ob iNOS in BZ-Populationen immunprotektive Mechanismen induzieren kann, ist auch interessant, welche Rolle dies möglicherweise im Rahmen einer *H. pylori*-Infektion hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von iNOS die Apoptose unter bestimmten Bedingungen inhibieren (171, 197, 221) und auch in PZ wichtig sein kann für ihr Überleben, wie kürzlich für murine, langlebige PZ, residierend im Knochenmark gezeigt wurde (176). In murinen Zellen scheint iNOS für die Reaktivität von PZ auf IL-6 notwendig

zu sein und wird auch selbst induziert durch IL-6 (176). Für humane PZ sind IL-6 und TNF- α Überlebensfaktoren (222), und in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Zytokine in der *H. pylori*-infizierten Magenschleimhaut präsent sind.

Für BZ-Populationen sind verschiedene Effektorfunktionsmechanismen bekannt. Neben der Produktion von Ig beinhalten diese ebenso die Produktion von Zytokinen und aufgrund der Daten dieser Arbeit naheliegend, möglicherweise auch iNOS-abhängige Mechanismen. Für letztere muss beachtet werden, dass das iNOS-Produkt, NO, und seine Derivate diverse Rollen haben. Im Kontext einer *H. pylori*-Infektion würde dies antimikrobielle (111) und potentiell tumorigene (128, 133, 223-226) Effekte während der Infektion bedeuten. Interessanterweise sind iNOS-Polymorphismen wahrscheinlich in den Krankheitsverlauf von Magenkarzinomen involviert (227, 228).

Die Aufklärung der induzierenden Signale und spezifischer Rolle(n) iNOS⁺ humaner PZ wird weitere Studien benötigen. Die vorliegende Arbeit bietet einen Anreiz für diese, da der neu beschriebene PZ-Phänotyp einen bedeutenden Leukozytentyp in der Antrum mukosa *H. pylori*-infizierter Patienten darstellt. Die Dichte dieser PZ war erhöht in Individuen, die eine experimentelle Infektion überwinden konnten, was auf eine mögliche Rolle bei der Bekämpfung der *H. pylori*-Infektion hindeutet. Jedoch sind iNOS⁺ PZ kein genereller Phänotyp von Immunzellen während gastrointestinaler Infektionen im Menschen. Denkbar ist, dass das unterschiedliche Milieu in Magen und Duodenum zusätzlich die Induktion von iNOS in PZ moduliert. Weitere longitudinale Studien sind erforderlich, um die Relevanz der Zelltyp-spezifischen Produktion von NO im Rahmen einer *H. pylori*-Infektion zu untersuchen und die Frage zu klären, ob die vorteilhaften oder nachteiligen Effekte der NO-Zwischenprodukte überwiegen.

6.2. Molekularbiologische Charakterisierung des IgH-Repertoires mukosaler Plasmazellen im Kontext einer chronischen *H. pylori*-Infektion

Die Analyse des exprimierten variablen und konstanten IgH-Repertoires der PZ während der Immunantwort auf eine chronische *H. pylori*-Infektion erlaubt Einblicke in die Mechanismen und die Komposition eines humanen mukosalen Repertoires während dieser Infektion. Um molekulare Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede iNOS⁻ und iNOS⁺ PZ festzustellen, die Hinweise auf die Entwicklung dieser Zellen geben könnten, wurden die IgH-Repertoires dieser PZ verschiedener *H. pylori*-Patienten hinsichtlich ihrer Isotypen, ihrer V_H- und J_H-Gen-Nutzung sowie Mutationen analysiert. Dies erfolgte nach Einzelzell-RT-PCR mit

anschließender *nested* PCR, bei welcher die cDNA einzelner Zellen amplifiziert wurde. Die aktuellen Studien für murine, langlebige PZ residierend im Knochenmark (176) lassen vermuten, dass iNOS⁺ PZ langlebiger sind als iNOS⁻ PZ. Die Entscheidung, ob eine PZ in den Pool der langlebigen PZ aufgenommen wird, könnte dabei in unterschiedlichen Entwicklungsstadien getroffen werden. Die Subpopulationen könnten sich ab einem bestimmten Zeitpunkt, an dem diese Entscheidung getroffen wurde, unabhängig voneinander entwickeln oder auseinander hervorgehen. Stellen iNOS⁺ PZ eine weiterentwickelte Subpopulation dar, könnte dies zufällig oder durch Selektion geschehen. Es sollten daher molekulare Hinweise für Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der beiden Subpopulationen gesammelt werden.

6.2.1. Verteilung der Immunglobulin-Isotypen

Die Verteilung der Ig-Isotypen unterschied sich nicht zwischen den drei *H. pylori*-infizierten Spendern und auch kaum zwischen iNOS⁻ und iNOS⁺ PZ-Subpopulationen. Dies lässt vermuten, dass es keine unterschiedlichen T-Zell-Einflüsse im Rahmen der Keimzentrumreaktionen gibt. In Übereinstimmung mit den Daten der mukosalen Antikörperlevel der Biopsieüberstände machten IgA-exprimierende PZ den größten Anteil (67-100 %) aller untersuchten PZ-Populationen aus, gefolgt von einem geringen IgG-Anteil (10-16 %), während IgM-exprimierende PZ fehlten. Die Analyse der Ig-Subklassen ergab, dass der am häufigsten exprimierte Subtyp IgA₁ war (61-70 %), gefolgt von IgA₂ (14-29 %), IgG₁ (5-13 %), IgG₃ (0-5 %) und IgG₂ (0-3 %). Diese Verhältnisse von IgA₁ zu IgA₂ von ca. 2:1 bis 5:1 entsprechen den Werten anderer Studien (229, 230). Interessanterweise zeigten die iNOS⁻ PZ von Spender HP2 ein konträres Verhältnis von IgA₁ zu IgA₂ (IgA₁ zu IgA₂: 1:2). Diese unterschiedliche Verteilung der Subtypen der iNOS⁻ PZ darf aufgrund der geringen Anzahl (n=9) nicht überinterpretiert werden, zeigt aber dennoch einen interessanten Aspekt. Es ist bekannt, dass sich die Verhältnisse von IgA₁ zu IgA₂ in der Mukosa zum distalen Bereich des Gastrointestinaltraktes ändern (229, 231, 232). Im Ileum findet man bereits eine gleiche Anzahl von IgA₁- und IgA₂-Immunzellen und schließlich im Kolon fast doppelt so viele IgA₂- wie IgA₁-Zellen (229, 232). Die beiden humanen IgA-Subklassen unterscheiden sich vor allem hinsichtlich ihrer flexiblen Hingeregion, die die beiden variablen Antikörperregionen mit dem Fc-Teil verbinden. IgA₁ zeigt eine verlängerte Hingeregion, die reich an Serin, Threonin und Prolin-Resten ist (233). IgA₁ Antikörper treten fast ausschließlich in einer monomeren, nicht-sekretorischen Form auf, im Unterschied zu IgA₂, welches vor allem in dimerer Form auftritt (234). Als Dimer, der sekretorischen Form (sIgA),

kann IgA mithilfe eines Polypeptides, der sogenannten sekretorischen Komponente durch das Epithel ins Lumen transportiert werden können. Die physiologische Funktion von IgA1 ist noch nicht vollständig geklärt. Einer der funktionellen Unterschiede der IgA-Subklassen ist der Antigen-Typ, den sie erkennen. So erkennen IgA1 hauptsächlich Proteinantigene, während IgA2 eher Kohlenhydrate erkennen; dennoch ist diese Differenzierung nicht absolut (235, 236). Die Ursache für diesen regionalen Unterschied ist unklar, könnte aber den Einfluss der lokalen luminalen Antigene oder der Mikrobiota widerspiegeln (237, 238). Die mukosalen Oberflächen, die durch IgA2-exprimierende Zellen dominiert werden, werden zusätzlich zum Kontakt mit pathogenen Mikroorganismen durch eine große Anzahl kommensaler Bakterien kolonisiert, während die höher gelegenen, weniger besiedelten Regionen des Gastrointestinaltraktes eher einer großen Menge von Lebensmittel-Antigenen ausgesetzt sind (232, 234). APRIL, produziert durch intestinale Epithelzellen oder Dendritische Zellen, wurde als Schlüsselfaktor im Antrieb eines T-Zell-unabhängigen IgA2 Klassenwechsel in Anwesenheit LPS-enthaltender Bakterien in der Kolonmukosa vorgeschlagen (239). IgA2 ist außerdem resistent gegen Proteasen, die von pathogenen Bakterien sezerniert werden, welche jedoch sehr leicht IgA1 schneiden können (240). Daher wäre es möglich, dass die unterschiedliche Verteilung von IgA-Subklassen auf den Typ der Antigenerkennung zurückzuführen ist, der an dem jeweiligen Ort von Vorteil ist. Im Fall einer *H. pylori*-Infektion könnte diese Subklassen-Verteilung jedoch von Nachteil sein, da die vornehmliche Produktion von IgA1 an diesem Besiedlungsort keinen ausreichenden Schutz gewährleistet. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung dafür sein, dass eine IgA-Defizienz von Patienten nicht mit dem *H. pylori*-Infektionsstatus korreliert (103).

6.2.2. Analyse der V_H-, und J_H-Gen-Nutzung

Es konnten insgesamt 35 verschiedene V_H-Gensegmente aus allen V_H-Familien außer V_H6 nachgewiesen werden, was bei einer angenommenen Gesamtanzahl von 51 funktionellen V_H-Gensegmenten einem Auftreten von 69 % der möglichen Gene entspricht (241). Die mit den ausgewählten Primern amplifizierten Sequenzen scheinen daher gut das Ig-Repertoire, der in der Magenmukosa vorkommenden PZ während einer *H. pylori*-Infektion, zu repräsentieren. Die Repertoire-Analyse der Segmente der variablen Region der schweren Antikörperketten zeigte eine auffällig häufige Nutzung der V_H3- und V_H4- Gensegmente bei den *H. pylori*-Patienten sowie V_H1-Gensegmente bei zwei der drei untersuchten Patienten. Hinsichtlich der V_H-Familien-Verteilung konnte zwischen iNOS⁻ und iNOS⁺ PZ kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In den PZ aller drei Spender wurden Gensegmente der V_H3-Familie am häufigsten (30 %, 41 % bzw. 53 %) gefunden. Diese Beobachtung stimmt mit

Repertoire-Analysen von Magenbiopsaten (242), von IgA⁺ PZ aus dem Darm (204) und auch von peripheren BZ-Populationen gesunder Spender überein (243, 244), bei denen zuvor gezeigt wurde, dass V_H3-Gene die am häufigsten benutzten Keimbahngene während der frühen BZ-Entwicklung sind, gefolgt von V_H4- und V_H1-Genen. Dies weist auf eine positive Selektion dieser Zellen, sowohl in verschiedenen Individuen als auch verschiedenen Geweben hin (245, 246). Wäre die Nutzung der Gensegmente rein zufällig, müsste jedes Gensegment mit einer Wahrscheinlichkeit von ~2 % genutzt werden. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie die Überexpression der Gensegmente V_H1-69, V_H3-11, V_H3-23, V_H3-30, V_H4-34, V_H4-59, V_H5-51 zeigt, die sich größtenteils auch in mukosalen IgA⁺ PZ gesunder Individuen finden lassen (204), jedoch nicht V_H1-69, welches eher mit MALT-Lymphomen des Magens assoziiert zu sein scheint (247). Der Vergleich der genutzten V_H-Gensegmente iNOS⁻ und iNOS⁺ PZ zeigte keinen eindeutigen Unterschied. Insgesamt ist jedoch bisher über die biologische Bedeutung der Nutzung verschiedener Gensegmente wenig bekannt. Eventuell spricht die häufige Nutzung bestimmter Gensegmente für einen Vorteil durch ihre Bindung eines verbreiteten Antigens.

Die Analyse der Nutzung der J_H-Genfamilien ergab, dass alle bekannten funktionellen J_H-Familien in dem mukosalen PZ-Repertoire der *H. pylori*-Patienten zu finden waren und dass keine unterschiedliche Nutzung zwischen den drei Patienten sowie den beiden PZ-Subpopulationen vorlag. Die häufige Nutzung der J_H4-Gensegmente in den drei *H. pylori*-Patienten stimmt mit Daten mukosaler IgA⁺ PZ aus dem Darm eines gesunden Spenders überein (204). Interessanterweise zeigte sich im Unterschied dazu in den *H. pylori*-Patienten eine häufigere Nutzung der J_H6-Genfamilie, was sich auch in der Analyse peripherer BZ (246) und BZ-Populationen in der Magenmukosa von Gastritis-Patienten zeigte (248). Die J_H-Genfamilien J_H1 und J_H2 wurden ebenso wie in anderen Repertoire-Analysen eher selten genutzt (204, 246, 248).

Die genauere Betrachtung der Paarungen der V_H-Gensegmente und J_H-Familien ergab, dass die häufigste Kombination in allen Spendern V_H3-23 mit J_H4 war und sowohl in iNOS⁺ als auch iNOS⁻ PZ vorkam. Dies spiegelt die häufige Nutzung dieser Gensegmente wider. Ebenso fällt die häufige Nutzung der Kombination von V_H5-51 mit J_H4 und V_H1-69 mit J_H6 auf, welche beide bereits für Gastritis-Patienten mit und ohne *H. pylori*-Hintergrund beschrieben wurden (248). V_H5-51/J_H4 soll in früheren Stadien der Repertoire-Entwicklung über positive Selektion durch Auto-Antigene häufiger genutzt werden (249, 250), während V_H1-69/J_H6 –wie bereits vorher diskutiert– in MALT-Lymphomen exprimiert wird (247). Es wurde bereits gezeigt, dass einige autoreaktive B- und T-Zellen während einer *H. pylori*-

Infektion aktiviert werden, insbesondere Zellen, die Oberflächenmoleküle von Epithelzellen erkennen und damit die pathologischen Prozesse verstärken (251).

Insgesamt wurden lediglich geringe Unterschiede hinsichtlich der V_H - und J_H -Nutzung bzw. -Rekombinationen zwischen den drei Patienten bzw. beiden PZ-Subpopulationen festgestellt. Dieses könnte darauf hindeuten, dass $iNOS^-$ und $iNOS^+$ PZ die gleiche Entwicklungsgeschichte der VDJ-Rekombination haben und den gleichen Selektionsprozessen unterliegen. Es scheint auch, dass die Merkmale, die typisch für eine Gastritis bzw. MALT-Lymphom sind, in einer ähnlichen Häufigkeit in den Repertoires aller drei Patienten und Subpopulationen zu finden sind. Dies spricht eher dafür, dass die $iNOS$ -Expression keinen Einfluss auf die Selektion hat oder eventuell erst später induziert wurde.

6.2.3. Mutationsanalyse

Um den Reifungsstatus und die Entwicklung der PZ einschätzen zu können, wurde die Häufigkeit der SHM in den V_H -Regionen (FWR1-FWR3) durch Vergleich mit der aus der Keimbahn vorhergesagten Gensequenzen analysiert. Folglich stellen die ermittelten Mutationsfrequenzen immer den kleinstmöglichen Wert dar. Da dies jedoch bei allen Zellen gleichermaßen erfolgte, waren die Ergebnisse miteinander vergleichbar. Die Analyse zeigte, dass sich die ermittelten globalen Mutationsfrequenzen der beiden zu vergleichenden Subpopulationen nicht voneinander unterschieden. Interessanterweise zeigten alle untersuchten Repertoires eine hohe Mutationshäufigkeit der V_H -Region (Median 12-15,5 %). Diese liegt damit deutlich über der Mutationsfrequenz der IgA^+ PZ aus dem Darm Gesunder Probanden, die bei 7,1 % liegt (204). Da die somatischen Mutationen im Rahmen einer Immunantwort in Keimzentren eingefügt werden (252), scheinen alle mukosalen PZ aufgrund der chronisch aktiven Immunantwort im Rahmen der *H. pylori*-Infektion von Zellen abzustammen, die durchschnittlich mehrmals solche Keimzentrumsreaktionen durchlaufen haben. Dabei könnte es sich um, durch wiederholten Antigenkontakt, aktivierte Gedächtniszellen handeln, die viele Mutationen akkumuliert haben.

Die Isotyp-spezifische Analyse der Mutationsfrequenzen ergab, dass sich die Isotypen $IgA1$, $IgA2$ und Gesamt- IgG nicht unterschieden. Dies spricht dafür, dass unabhängig vom Isotyp alle Antikörper durch wiederholten Antigenkontakt hinsichtlich ihrer Affinität gereift waren. Die Analyse getrennt nach den verschiedenen V_H -Familien hingegen ergab einen Unterschied der Mutationshäufigkeiten, denn PZ, die V_{H2} - und V_{H5} -Gensegmente exprimierten, zeigten eine leicht reduzierte Mutationshäufigkeit (Mittelwerte HP1-3: 8,8 % bzw. 10,85 %) im Vergleich zu den V_H -Familien V_{H1} -, V_{H3} - und V_{H4} (Mittelwerte HP1-3: 12,8 %, 12,5 % bzw.

13,3 %), sodass hier vermutlich eine V_H -Familien-spezifische Selektion vorliegt, die die häufige Nutzung dieser V_H -Familien aller untersuchter PZ erklären könnte.

Die Analyse der SHM aufgetrennt nach FWR und CDRH-Bereiche, insbesondere im Hinblick auf die Verhältnisse von R-Mutationen zu stillen S-Mutationen, kann Einblick in den zugrunde liegenden Selektionsprozess geben. Das Muster der SHM der IgH-Sequenzen passt zu der Hypothese der Antigen-Selektion, d.h., die CDR1-3 R/S-Mutationsverhältnisse sind deutlich größer (HP1: 2,7; HP2: 3,3 $iNOS^+$ und 3,8 in $iNOS^-$ PZ; HP3: 2,8 $iNOS^+$ und 3,1 in $iNOS^-$ PZ) als die R/S-Verhältnisse von FWR1-3 (HP1: 1,7; HP2: 1,7 $iNOS^+$ und 1,4 in $iNOS^-$ PZ; HP3: 2,1 $iNOS^+$ und 2,2 in $iNOS^-$ PZ). Die ermittelten R/S-Verhältnisse waren für die drei verschiedenen Spender bzw. auch größtenteils für $iNOS^-$ und $iNOS^+$ PZ nahezu identisch. Es fällt jedoch auf, dass die CDR1-3 R/S-Mutationsverhältnisse für $iNOS^-$ PZ etwas größer waren als für die $iNOS^+$ PZ. Dies könnte bedeuten, dass die Selektion gegen weitere R-Mutationen in den CDRHs der $iNOS^+$ PZ für die Expression von Antikörpern spricht, die bereits eine hohe Spezifität für ihr Antigen besitzen. Die Berechnung der R/S-Verhältnisse für die einzelnen Spender getrennt nach Isotypen ergab keine signifikanten Unterschiede; lediglich der bereits beobachtete Unterschied zwischen FWRs und CDRHs wurde bestätigt.

6.2.4. Analyse der CDRH3-Längen und Klonalität

Die Untersuchung der IgH-Sequenzen der mukosalen PZ *H. pylori*-infizierter Patienten hinsichtlich ihrer CDRH3-Längen zeigte eine starke Variation der Anzahl der Nukleotide für alle drei Spender. Die durchschnittlichen CDRH3-Längen der einzelnen Spender und der PZ-Subpopulationen lagen bei 45-49,5 bp ohne signifikanten Unterschied. Auch bei Auftrennung nach Ig-Isotyp zeigten sich keine Unterschiede in der CDRH3-Längenverteilung. Im Vergleich zu anderen Analysen, bei welchen periphere BZ (242, 246), BZ aus MALT-Lymphomen (247) oder IgA^+ PZ aus der Darmmukosa (204) untersucht wurden, waren die in der vorliegenden Arbeit ermittelten durchschnittlichen CDRH3-Längen größer. Diese Ergebnisse stimmen mit Ergebnissen einer Studie überein, bei der gezeigt wurde, dass die CDRH3-Längen im Ig-Repertoire mukosaler Gewebe größer sind als in lymphatischen Geweben oder peripherem Blut; außerdem zeigt die Studie auch etwas längere CDRH3-Regionen im Repertoire aus der Magenmukosa verglichen mit der Dünndarmmukosa (242). Die Daten lassen vermuten, dass mukosale Ig-Repertoire möglicherweise auf eine längere CDRH3-Länge selektiert werden, um spezifisch und effektiv auf bestimmte Antigene bzw. Pathogene zu reagieren, die eher an mukosalen Oberflächen zu finden sind.

Die Identifizierung klonal verwandter Zellen (209) ergab für zwei der drei *H. pylori*-Patienten Zellen, die in ihrer V_HDJ_H -Rekombination und CDRH3-Länge identisch waren. Insgesamt wurden fünf Paar klonal verwandte Zellen unter 124 analysierten Zellen gefunden, d.h., die Mehrheit der untersuchten Zellen zeigte eine unabhängige Entwicklung. Dieser Prozentsatz von ca. 8 % klonal verwandter Zellen entspricht den Werten von IgA- bzw. IgG-PZ im Darm gesunder Probanden mit 3,7 % (8 von 216 Antikörpern) bzw. 11,8 % (17 von 144 Antikörpern)(204). Hinsichtlich ihrer Mutationen unterschieden sich jeweils die beiden klonal verwandten Zellen. Dies legt den Schluss nahe, dass sich diese Zellen aus einer gemeinsamen Zelle unabhängig voneinander weiter entwickelten. Die Verzweigung der Entwicklung scheint während der Affinitätsreifung im Keimzentrum stattgefunden zu haben, sodass weitere Mutationen akkumuliert werden konnten.

6.2.5. Zusammenfassung hinsichtlich des IgH-Repertoires

Die von $iNOS^+$ und $iNOS^-$ PZ exprimierten Ig-Gene unterschieden sich nicht hinsichtlich ihrer Isotypen und Mutationsfrequenzen. Auch hinsichtlich der V_H - und J_H -Gen-Nutzung sowie den CDRH3-Längen konnten keine Unterschiede ermittelt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass $iNOS^+$ und $iNOS^-$ PZ vermutlich dieselbe Entwicklung durchlaufen, welche anscheinend nicht durch die $iNOS$ -Expression beeinflusst wird.

Insgesamt bestätigte sich im Vergleich zu anderen PZ-Repertoire-Analysen, dass die Anteile der V_H Familien zwar nicht verschoben waren, aber die Verteilung der J_H -Elemente mit einer Dominanz von J_H6 sehr auffällig war. Im Unterschied zu der enormen genetischen Diversität möglicher naiver BZR lässt die Analyse der V_HJ_H -Kombinationen der PZ-Repertoires einen relativ kleinen Klon-Pool vermuten, der auf eine starke Antigen-Selektion hinweist. Es zeigte sich eine häufige Nutzung einzelner V_H -Gene, die mit MALT-Lymphomen oder Autoreaktivität assoziiert werden, und diese wird vermutlich durch die Anwesenheit von *H. pylori* induziert. Ebenso auffällig ist die Längenverteilung hin zu längeren CDRH3-Domänen, welche nach entsprechenden Selektionsprozessen in der Affinitätsreifung eine Anpassung an die Immunantwort im mukosalen Gewebe zu sein scheint. Ein hoher Anteil an V_H -Mutationen wies indirekt auf eine T-Zell-abhängige Affinitätsreifung hin.

Dieses Ergebnis passt zu der Hypothese, dass dauerhafte ineffektive chronische Immunaktivierung bei mangelnder T-Zellaktivierung eine Persistenz der Erreger und eine unkontrollierte Reaktivität auch gegen körpereigene Strukturen zur Folge haben kann, woraus sich final eine erregerunabhängige, maligne Erkrankung entwickeln kann (253, 254). Eine Bestätigung dieser ersten Ergebnisse würde nicht nur die molekularen Verständnisansätze der

MALT-Lymphomagenese von der erregergetriebenen und -abhängigen zu der erregerunabhängigen MALT-Form erweitern, sondern könnte längerfristig auch zur Verbesserung der MALT-Therapie beitragen.

6.3. Generierung rekombinanter Antikörper einzelner mukosaler Plasmazellen im Kontext einer chronischen *H. pylori*-Infektion

Die Isolierung individueller Zellen mittels Einzelzell-FACS-Sortierung erlaubt die Klonierung von Antikörpern definierter BZ-Populationen verschiedenen Ursprungs, sogar wenn die Zellen mit einer sehr geringen Häufigkeit auftreten oder die absolute Probengröße klein ist. Demnach war die Methode nach Tiller et al. (178) sehr gut geeignet, um die Antikörper von iNOS⁺ und iNOS⁻ PZ zu analysieren.

Die erfolgreiche Klonierung der variablen Regionen leichter und schwerer Antikörperketten in IgG1-Expressionsvektoren ergab 14 Vektoren-Paare, welche sich aus elf iNOS⁺ und drei iNOS⁻ PZ eines *H. pylori*-Patienten zusammensetzten. Nach Ko-Transfektion in eukaryotische HEK-293T Zellen konnten rekombinante Antikörper von elf iNOS⁺ und zwei iNOS⁻ PZ hergestellt werden, die in den Überständen Konzentrationen von 2,5 bis 83 µg/ml aufwiesen und nachweislich aus leichter und schwerer Kette bestanden. Die Reaktivität dieser rekombinanten Antikörper wurde sowohl mittels ELISA als auch Western-Blot analysiert. Beide Methoden identifizierten je einen Antikörper, der spezifisch *H. pylori* Antigene binden konnte. Die ELISA-Daten zeigten, dass der rekombinante Antikörper 6A spezifisch ein lösliches natives Antigen des Wildtyps *H. pylori* P12 bindet. Die Western-Blot-Analyse konnte für den Antikörper 5C eine Bindspezifität für VacA nachweisen. Beide *H. pylori*-spezifische Antikörper stammten aus iNOS⁺ PZ, haben jedoch einen unterschiedlichen Isotyp. Antikörper 6A ist ein IgA2-Antikörper und Antikörper 5C hatte ursprünglich den Isotyp IgA1. Gemeinsam ist beiden Antikörpern jedoch, dass sie die Segmente V_H1-69 in Verbindung mit J_H3 nutzten und mit 216 bp die gleiche Länge der V-Region haben. Weiterhin nutzten beide Antikörper als leichte Kette die kappa-Kette. Es scheint somit, dass diese Eigenschaften tatsächlich durch *H. pylori*-spezifische Antigene, positiv selektioniert wurden. Möglicherweise ist die Nutzung von V_H1-69 demnach ursprünglich nicht wie beschrieben mit MALT-Lymphomen des Magens (247), sondern tatsächlich mit der Abwehr von *H. pylori* assoziiert und tritt in Folge einer nicht ausreichenden Immunität und der chronischen Entzündung häufig bei MALT-Lymphomen auf.

Um die Hypothese zu untersuchen, dass es sich bei den IgA2-Antikörpern eher um Antikörper handelt, die vor allem Antigene mit sich wiederholenden Strukturen wie LPS und/oder DNA

binden können, wurden die rekombinanten Antikörper mittels ELISA auf die Reaktivität gegen LPS, dsDNA und ssDNA analysiert. Diese Reaktivitätsuntersuchungen ermöglichten es, eine Polyreaktivität der Antikörper aufzudecken. Polyreaktive IgA-Antikörper sind für die Abwehr von kommensalen Bakterien und zur Vermittlung regulatorischer Funktionen durch Immunausschluss luminaler Antigene von Bedeutung (210, 211). Sie zeigen außerdem eine geringere Affinität und breite Spezifität, und ihre Sekretion scheint bedeutend für die Aufrechterhaltung der Darmhomöostase zu sein (238). Die ELISA-Profile zeigten, dass fünf der getesteten rekombinanten Antikörper polyreaktiv waren, d.h. LPS und dsDNA/ssDNA banden. Diese fünf polyreaktiven Antikörper entstammten iNOS⁺ PZ. Da drei der Antikörper vom Isotyps IgA1 und je einer IgA2 bzw. IgG3 war, zeigte sich, dass die Polyreaktivität nicht vom Isotyp abhängig war und dass die LPS-Reaktivität nicht auf IgA2-Antikörper beschränkt war. Hinsichtlich der Gensegment-Nutzung ergab die Analyse, dass vier der polyreaktiven Antikörper ein J_H4-Segment nutzen und zwei davon sogar in Kombination mit V_H3-23, die Kombination, die häufig bei Gastritis-Patienten mit oder ohne *H. pylori*-Hintergrund gefunden wird (248). Möglicherweise tragen diese polyreaktiven Antikörper in der Magenmukosa eher zu pathologischen Veränderungen bei, als dass sie einen schützenden oder regulierenden Effekt haben.

Es bleibt weiterhin ungeklärt, welchen Einfluss die iNOS-Expression auf die Antikörper-Produktion oder -Selektion haben könnte. Auch wenn die beiden *H. pylori*-spezifischen Antikörper aus dem iNOS⁺ PZ-Repertoire stammten, war doch die Anzahl analysierter iNOS⁻ PZ sehr gering, und molekularbiologische Unterschiede der variablen IgH-Region waren kaum erkennbar. Die Population iNOS⁺ IgA⁺ PZ innerhalb der intestinalen Lamina propria wurde ursprünglich in Mäusen unter mikrobieller Ko-Stimulation beschrieben (177). In Mäusen resultiert die Deletion von TNF- α und iNOS in allen BZ-Populationen in einer verminderten IgA-Produktion. Zusätzlich wurde gezeigt, dass iNOS oder NO den IgA-Isotypwechsel in BZ auf dem Expressionslevel der AID reguliert, ein Schlüsselenzym des Ig-Klassenwechsels (124, 255). In Mäusen resultiert der Verlust von iNOS⁺ IgA⁺ PZ auch in einer veränderten Diversifikation der Darmmikrobiota und in einer schlechteren Abwehr von *Citrobacter rodentium* (177). Dies deutet darauf hin, dass dieser PZ-Phänotyp eine wichtige Rolle für die Homöostase von Mukosa und Mikrobiota spielt und mit der Darm-Immunität assoziiert ist. Die Natur der schützenden Immunität gegen eine *H. pylori*-Infektion bleibt jedoch schwer zu definieren. Die meisten derzeitigen Erkenntnisse zu diesem Thema stammen aus Tiermodellen und sind leider nicht vollständig auf die Situation im Menschen übertragbar. Da es sich bei *H. pylori* um ein humanpathogenes Bakterium mit hoher Spezies-

Spezifität handelt, unterscheidet sich die Pathogenese und Immunität gegen *H. pylori* in Mäusen deutlich von der im Menschen. Zum Beispiel bedingt *H. pylori* in Mäusen lediglich schwach entzündliche Reaktionen ohne Entwicklung *H. pylori*-assoziierter pathologischer Veränderungen (256, 257). Außerdem sind die Daten bezüglich der Relevanz von BZ und/oder Antikörpern für die Eradikation von *H. pylori* in Mäusen unstimmig. Eine Studie an Mäusen zeigte, dass eine schützende Immunität gegenüber der Infektion mit *H. pylori* auch in Abwesenheit von Antikörpern erreicht werden kann (101). Im Unterschied dazu fanden Gorrell et al. (258) kürzlich, dass sechs Monate nach Infektion und im Vergleich zu Kontrolltieren eine signifikant erhöhte *H. pylori* Belastung im Magen von Mäusen, die nicht in der Lage waren, sekretorische Antikörper zu produzieren. Demzufolge könnten spezielle Eigenschaften der PZ- und BZ-Kompartments einschließlich der iNOS⁺ PZ-Population in Menschen relevanter sein als in Mäusen. In Voruntersuchungen wurde gezeigt, dass die Anzahl mukosaler iNOS⁺, IgA⁺ PZ mit der Eradikation einer experimentellen *H. pylori*-Infektion korrelierte (169). Epidemiologische Studien hingegen, haben keine Korrelation zwischen IgA-Defizienz und *H. pylori*-Infektionsstatus gezeigt. Daher wurde IgA keine Hauptrolle im Rahmen der *H. pylori*-Immunität zugesprochen (98, 103, 259). Diese Studien wurden jedoch nicht konzipiert, um die Rolle iNOS⁺, IgA⁺ PZ zu untersuchen. Tatsächlich sollte die IgA-Sekretion für sich allein keine Rolle in dem Kontext spielen. Es ist eher anzunehmen, dass die iNOS-Expression und die IgA-Sezernierung in dieser PZ-Population eine Art Marker für die PZ darstellen, die in der Abwehr von *H. pylori* involviert sind. Zum Beispiel lassen die Daten dieser Arbeit vermuten, dass eine erhöhte IFN- γ und TNF- α Sekretion durch mukosale iNOS⁺ PZ die Th1-Typ CD4⁺ T-Zellantwort unterstützt, die in einigen *H. pylori*-infizierten Individuen schützend zu sein scheint (10).

Weitere Studien sind erforderlich, um die Relevanz der NO-Produktion dieser PZ zu untersuchen und die Frage zu klären, ob die Zelltyp-spezifische Zytokin-Produktion einen protektiven Effekt in einer *H. pylori*-Infektion hat.

Zusammenfassend könnten die gewonnenen Erkenntnisse das Potential haben die Rolle iNOS-exprimierender PZ in der Abwehr von *H. pylori* aufzuklären und auf diese Weise eventuell langfristig die Forschungen der Impfstoffentwicklung und alternativer Behandlungsmethoden voranzubringen.

6.4. Ausblick

Diese Arbeit trägt zum Verständnis der humanen Abwehr einer *H. pylori*-Infektion bei, auch wenn neue Fragen aufgeworfen wurden. Die phänotypische Analyse der PZ-Subpopulationen, die sich hinsichtlich ihrer iNOS-Expression unterschieden (iNOS⁺ und iNOS⁻ PZ), deutete darauf hin, dass iNOS⁺ PZ im Unterschied zu iNOS⁻ PZ eine Subpopulation darstellen, die proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ und TNF- α sezernierten. Die molekularbiologischen Untersuchungen dieser beiden Subpopulationen lieferten Hinweise darauf, dass es sich dabei um zwei ähnlich entwickelte und selektionierte Zellpopulationen handelt. Jedoch konnten Antikörper-Spezifitäten für *H. pylori*-Antigene nur für iNOS⁺ PZ gezeigt werden. Weiterführende Analysen sollten die Identifizierung des durch den Antikörper 6A erkannten Antigens einschließen. Es könnten z.B. 2D-Gelelektrophoresen durchgeführt werden, und für den Spot, der gebunden wird, könnte mittels Massenspektrometrie die Aminosäuresequenz ermittelt und dann mithilfe der Gendatenbank *H. pylori*-exprimierter Gene das Protein bestimmt werden. Außerdem könnte 6A auf die Fähigkeit geprüft werden, das Antigen auch im denaturierten Zustand zu binden. Eine Limitation in dieser Arbeit waren die geringen Patientenzahlen, daher sollten die Ergebnisse der Analyse der Reaktivität rekombinanter Antikörper in weiteren Patienten bestätigt und dabei die Anzahl analysierter iNOS⁻ PZ erhöht werden. Eine weitere Limitation der Untersuchung humaner Probenmaterialien stellt der Mangel an Informationen über die Dauer der *H. pylori*-Infektion sowie anderer Infektionen zum Zeitpunkt der Probenentnahme dar. Weitere Untersuchungen der exprimierten Ig hinsichtlich der Antigen-Spezifität gegen verschiedene kommensale Bakterien und pathogenen Bakterien wie *Salmonella* oder *Campylobacter* könnten Erkenntnisse über eine mögliche Rolle der Antikörper liefern. Die rekombinanten Antikörper könnten auch verwendet werden, um histologische Schnitte zu färben und so die Reaktivität direkt im infizierten mukosalen Gewebe zu prüfen.

Ein weiterer interessanter Aspekt wäre die Analyse der Verhältnisse von IgA1 zu IgA2 in den Biopsieüberständen der Studienteilnehmer, die eine *H. pylori*-Infektion bekämpfen konnten im Vergleich zu den chronisch Infizierten und ebenso in Überständen von MALT-Lymphom-Biopsaten. Schließlich könnten mittels Transkriptom-Analysen weitere Moleküle ermittelt werden, die der Unterscheidung der Subpopulationen dienen bzw. Aufschluss über den Einfluss der NO-Produktion auf die Expression von Differenzierungsmarkern von BZ geben könnten.

Die Untersuchung dieser Aspekte sollte zum Verständnis der humoralen Immunantwort bzw. dem Einfluss der verschiedenen BZ-Populationen auf die Bekämpfung einer *H. pylori*-

Infektion, vor allem im Hinblick auf die Entwicklung neuer Impfmethoden, aber auch therapeutischer Strategien beitragen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Marshall, B. J., J. A. Armstrong, D. B. McGeachie, and R. J. Glancy. 1985. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust* 142: 436-439.
2. Marshall, B. J., and J. R. Warren. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-1315.
3. Feldman, R. A., A. J. Eccersley, and J. M. Hardie. 1998. Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio. *Br Med Bull* 54: 39-53.
4. Suerbaum, S., and M. Achtman. 2004. *Helicobacter pylori*: recombination, population structure and human migrations. *Int J Med Microbiol* 294: 133-139.
5. Malaty, H. M., and D. Y. Graham. 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 35: 742-745.
6. Malaty, H. M., and O. Nyren. 2003. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 8 Suppl 1: 8-12.
7. Malaty, H. M., A. El-Kasabany, D. Y. Graham, C. C. Miller, S. G. Reddy, S. R. Srinivasan, Y. Yamaoka, and G. S. Berenson. 2002. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet* 359: 931-935.
8. Malfertheiner, P., F. Megraud, C. O'Morain, F. Bazzoli, E. El-Omar, D. Graham, R. Hunt, T. Rokkas, N. Vakil, and E. J. Kuipers. 2007. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 56: 772-781.
9. Taylor, N. S., J. G. Fox, N. S. Akopyants, D. E. Berg, N. Thompson, B. Shames, L. Yan, E. Fontham, F. Janney, F. M. Hunter, and et al. 1995. Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 33: 918-923.
10. Aebischer, T., D. Bumann, H. J. Epple, W. Metzger, T. Schneider, G. Cherepnev, A. K. Walduck, D. Kunkel, V. Moos, C. Loddenkemper, I. Jiadze, M. Panasyuk, M. Stolte, D. Y. Graham, M. Zeitz, and T. F. Meyer. 2008. Correlation of T cell response and bacterial clearance in human volunteers challenged with *Helicobacter pylori* revealed by randomised controlled vaccination with Ty21a-based *Salmonella* vaccines. *Gut* 57: 1065-1072.
11. Mitchell, H., and F. Megraud. 2002. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 7 Suppl 1: 8-16.
12. Hirschl, A. M., and A. Makristathis. 2007. Methods to detect *Helicobacter pylori*: from culture to molecular biology. *Helicobacter* 12 Suppl 2: 6-11.
13. Megraud, F. 2004. Basis for the management of drug-resistant *Helicobacter pylori* infection. *Drugs* 64: 1893-1904.
14. O'Connor, A., J. P. Gisbert, D. McNamara, and C. O'Morain. 2010. Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2010. *Helicobacter* 15 Suppl 1: 46-52.
15. Goh, K. L., W. K. Chan, S. Shiota, and Y. Yamaoka. 2011. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. *Helicobacter* 16 Suppl 1: 1-9.
16. Svennerholm, A. M., and A. Lundgren. 2007. Progress in vaccine development against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50: 146-156.
17. Blanchard, T. G., and S. J. Czinn. 2015. Current Status and Prospects for a *Helicobacter pylori* Vaccine. *Gastroenterol Clin North Am* 44: 677-689.
18. Zawahir, S., S. J. Czinn, J. G. Nedrud, and T. G. Blanchard. 2013. Vaccinating against *Helicobacter pylori* in the developing world. *Gut Microbes* 4: 568-576.
19. Blaser, M. J., and J. Parsonnet. 1994. Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J Clin Invest* 94: 4-8.

20. Dixon, M. F. 2001. Pathology of Gastritis and Peptic Ulceration. In *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. H. L. T. Mobley, G. L. Mendz, and S. L. Hazell, eds, Washington (DC).
21. Nomura, A., G. N. Stemmermann, P. H. Chyou, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blaser. 1994. Helicobacter pylori infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Annals of internal medicine* 120: 977-981.
22. Parsonnet, J., G. D. Friedman, D. P. Vandersteen, Y. Chang, J. H. Vogelstein, N. Orentreich, and R. K. Sibley. 1991. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 325: 1127-1131.
23. Wotherspoon, A. C., C. Ortiz-Hidalgo, M. R. Falzon, and P. G. Isaacson. 1991. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *The Lancet* 338: 1175-1176.
24. 1994. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* 61: 1-241.
25. Wotherspoon, A. C., C. Doglioni, T. C. Diss, L. Pan, A. Moschini, M. de Boni, and P. G. Isaacson. 1993. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori. *Lancet* 342: 575-577.
26. Bertoni, F., B. Coiffier, G. Salles, A. Stathis, A. Traverse-Glehen, C. Thieblemont, and E. Zucca. 2011. MALT lymphomas: pathogenesis can drive treatment. *Oncology (Williston Park)* 25: 1134-1142, 1147.
27. Guo, Q., S. Guo, and Y. Zhang. 2013. Treatment of gastric MALT lymphoma with a focus on Helicobacter pylori eradication. *Int J Hematol* 97: 735-742.
28. Parsonnet, J., and P. G. Isaacson. 2004. Bacterial infection and MALT lymphoma. *N Engl J Med* 350: 213-215.
29. Zhang, Q. B., I. M. Nakashabendi, M. S. Mokhashi, J. B. Dawodu, C. G. Gemmell, and R. I. Russell. 1996. Association of cytotoxin production and neutrophil activation by strains of Helicobacter pylori isolated from patients with peptic ulceration and chronic gastritis. *Gut* 38: 841-845.
30. Jaiswal, M., N. F. LaRusso, and G. J. Gores. 2001. Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G626-634.
31. Lala, P. K., and C. Chakraborty. 2001. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol* 2: 149-156.
32. Farinha, P., and R. D. Gascoyne. 2005. Molecular pathogenesis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Clin Oncol* 23: 6370-6378.
33. Cussac, V., R. L. Ferrero, and A. Labigne. 1992. Expression of Helicobacter pylori urease genes in Escherichia coli grown under nitrogen-limiting conditions. *Journal of bacteriology* 174: 2466-2473.
34. McGee, D. J., and H. L. Mobley. 1999. Mechanisms of Helicobacter pylori infection: bacterial factors. *Current topics in microbiology and immunology* 241: 155-180.
35. Stingl, K., E. M. Uhlemann, R. Schmid, K. Altendorf, and E. P. Bakker. 2002. Energetics of Helicobacter pylori and its implications for the mechanism of urease-dependent acid tolerance at pH 1. *Journal of bacteriology* 184: 3053-3060.
36. Suerbaum, S., C. Josenhans, and A. Labigne. 1993. Cloning and genetic characterization of the Helicobacter pylori and Helicobacter mustelae flaB flagellin genes and construction of H. pylori flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *Journal of bacteriology* 175: 3278-3288.

37. Schreiber, S., M. Konradt, C. Groll, P. Scheid, G. Hanauer, H. O. Werling, C. Josenhans, and S. Suerbaum. 2004. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5024-5029.
38. Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Boren. 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 279: 373-377.
39. Odenbreit, S., M. Till, D. Hofreuter, G. Faller, and R. Haas. 1999. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol* 31: 1537-1548.
40. Mahdavi, J., B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, S. Teneberg, K. A. Karlsson, S. Altraja, T. Wadstrom, D. Kersulyte, D. E. Berg, A. Dubois, C. Petersson, K. E. Magnusson, T. Norberg, F. Lindh, B. B. Lundskog, A. Arnqvist, L. Hammarstrom, and T. Boren. 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 297: 573-578.
41. Yamaoka, Y., D. H. Kwon, and D. Y. Graham. 2000. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7533-7538.
42. Odenbreit, S., B. Wieland, and R. Haas. 1996. Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain. *Journal of bacteriology* 178: 6960-6967.
43. Seyler, R. W., Jr., J. W. Olson, and R. J. Maier. 2001. Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization. *Infect Immun* 69: 4034-4040.
44. Phadnis, S. H., D. Ilver, L. Janzon, S. Normark, and T. U. Westblom. 1994. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 62: 1557-1565.
45. Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang, N. Figura, and et al. 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5791-5795.
46. Weel, J. F., R. W. van der Hulst, Y. Gerrits, P. Roorda, M. Feller, J. Dankert, G. N. Tytgat, and A. van der Ende. 1996. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J Infect Dis* 173: 1171-1175.
47. Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek, Jr., M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 270: 17771-17777.
48. Ohnishi, N., H. Yuasa, S. Tanaka, H. Sawa, M. Miura, A. Matsui, H. Higashi, M. Musashi, K. Iwabuchi, M. Suzuki, G. Yamada, T. Azuma, and M. Hatakeyama. 2008. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1003-1008.
49. Xiang, Z., S. Censini, P. F. Bayeli, J. L. Telford, N. Figura, R. Rappuoli, and A. Covacci. 1995. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 63: 94-98.
50. Terebiznik, M. R., C. L. Vazquez, K. Torbicki, D. Banks, T. Wang, W. Hong, S. R. Blanke, M. I. Colombo, and N. L. Jones. 2006. *Helicobacter pylori* VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells. *Infect Immun* 74: 6599-6614.

51. Amieva, M. R., R. Vogelmann, A. Covacci, L. S. Tompkins, W. J. Nelson, and S. Falkow. 2003. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 300: 1430-1434.
52. Molinari, M., M. Salio, C. Galli, N. Norais, R. Rappuoli, A. Lanzavecchia, and C. Montecucco. 1998. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med* 187: 135-140.
53. Kuck, D., B. Kolmerer, C. Iking-Konert, P. H. Krammer, W. Stremmel, and J. Rudi. 2001. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun* 69: 5080-5087.
54. Cover, T. L., U. S. Krishna, D. A. Israel, and R. M. Peek, Jr. 2003. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res* 63: 951-957.
55. Galmiche, A., J. Rassow, A. Doye, S. Cagnol, J. C. Chambard, S. Contamin, V. de Thillot, I. Just, V. Ricci, E. Solcia, E. Van Obberghen, and P. Boquet. 2000. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J* 19: 6361-6370.
56. Neu, B., P. Randlkofer, M. Neuhofer, P. Volland, A. Mayerhofer, M. Gerhard, W. Schepp, and C. Prinz. 2002. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of rat gastric parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G309-318.
57. Kobayashi, H., S. Kamiya, T. Suzuki, K. Kohda, S. Muramatsu, T. Kurumada, U. Ohta, M. Miyazawa, N. Kimura, N. Mutoh, T. Shirai, A. Takagi, S. Harasawa, N. Tani, and T. Miwa. 1996. The effect of *Helicobacter pylori* on gastric acid secretion by isolated parietal cells from a guinea pig. Association with production of vacuolating toxin by *H. pylori*. *Scand J Gastroenterol* 31: 428-433.
58. Boncristiano, M., S. R. Paccani, S. Barone, C. Ulivieri, L. Patrussi, D. Ilver, A. Amedei, M. M. D'Elisio, J. L. Telford, and C. T. Baldari. 2003. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med* 198: 1887-1897.
59. Gebert, B., W. Fischer, E. Weiss, R. Hoffmann, and R. Haas. 2003. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* 301: 1099-1102.
60. Censini, S., C. Lange, Z. Xiang, J. E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, and A. Covacci. 1996. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14648-14653.
61. Covacci, A., S. Falkow, D. E. Berg, and R. Rappuoli. 1997. Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*? *Trends Microbiol* 5: 205-208.
62. Fischer, W., J. Puls, R. Buhrdorf, B. Gebert, S. Odenbreit, and R. Haas. 2001. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* 42: 1337-1348.
63. Odenbreit, S., J. Puls, B. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer, and R. Haas. 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287: 1497-1500.
64. Segal, E. D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins. 1999. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14559-14564.
65. Asahi, M., T. Azuma, S. Ito, Y. Ito, H. Suto, Y. Nagai, M. Tsubokawa, Y. Tohyama, S. Maeda, M. Omata, T. Suzuki, and C. Sasakawa. 2000. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med* 191: 593-602.

66. Moese, S., M. Selbach, T. Kwok, V. Brinkmann, W. König, T. F. Meyer, and S. Backert. 2004. *Helicobacter pylori* induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways. *Infect Immun* 72: 3646-3649.
67. Wang, J., E. G. Brooks, K. B. Bamford, T. L. Denning, J. Pappo, and P. B. Ernst. 2001. Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion. *J Immunol* 167: 926-934.
68. Yamaoka, Y., M. Kita, T. Kodama, N. Sawai, T. Tanahashi, K. Kashima, and J. Imanishi. 1998. Chemokines in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 42: 609-617.
69. Wotherspoon, A. C. 1996. Gastric MALT lymphoma and *Helicobacter pylori*. *Yale J Biol Med* 69: 61-68.
70. Zevering, Y., L. Jacob, and T. F. Meyer. 1999. Naturally acquired human immune responses against *Helicobacter pylori* and implications for vaccine development. *Gut* 45: 465-474.
71. Wilson, K. T., and J. E. Crabtree. 2007. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology* 133: 288-308.
72. Suzuki, T., K. Kato, S. Ohara, K. Noguchi, H. Sekine, H. Nagura, and T. Shimosegawa. 2002. Localization of antigen-presenting cells in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Pathol Int* 52: 265-271.
73. Portal-Celhay, C., and G. I. Perez-Perez. 2006. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. *Clinical science (London, England : 1979)* 110: 305-314.
74. Prinz, C., N. Hafsi, and P. Volland. 2003. *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends Microbiol* 11: 134-138.
75. Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1: 135-145.
76. Schmausser, B., M. Andrulis, S. Endrich, S. K. Lee, C. Josenhans, H. K. Müller-Hermelink, and M. Eck. 2004. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp Immunol* 136: 521-526.
77. Smith, M. F., Jr., A. Mitchell, G. Li, S. Ding, A. M. Fitzmaurice, K. Ryan, S. Crowe, and J. B. Goldberg. 2003. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 278: 32552-32560.
78. Kranzer, K., A. Eckhardt, M. Aigner, G. Knoll, L. Deml, C. Speth, N. Lehn, M. Rehli, and W. Schneider-Brachert. 2004. Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 72: 4416-4423.
79. Anand, A. R., M. Cucchiari, E. F. Terwilliger, and R. K. Ganju. 2008. The tyrosine kinase Pyk2 mediates lipopolysaccharide-induced IL-8 expression in human endothelial cells. *J Immunol* 180: 5636-5644.
80. Takeda, K., and S. Akira. 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16: 3-9.
81. Crabtree, J. E. 1996. Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 10 Suppl 1: 29-37.
82. Hafsi, N., P. Volland, S. Schwendy, R. Rad, W. Reindl, M. Gerhard, and C. Prinz. 2004. Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro. *J Immunol* 173: 1249-1257.
83. Kuo, S. H., L. T. Chen, C. L. Chen, S. L. Doong, K. H. Yeh, M. S. Wu, T. L. Mao, H. C. Hsu, H. P. Wang, J. T. Lin, and A. L. Cheng. 2005. Expression of CD86 and increased infiltration of NK cells are associated with *Helicobacter pylori*-dependent

- state of early stage high-grade gastric MALT lymphoma. *World J Gastroenterol* 11: 4357-4362.
84. Algood, H. M., J. Gallo-Romero, K. T. Wilson, R. M. Peek, Jr., and T. L. Cover. 2007. Host response to *Helicobacter pylori* infection before initiation of the adaptive immune response. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51: 577-586.
 85. Crabtree, J. E., and I. J. Lindley. 1994. Mucosal interleukin-8 and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 6 Suppl 1: S33-38.
 86. Xia, H. H., S. K. Lam, X. R. Huang, W. M. Wong, S. Y. Leung, S. T. Yuen, H. Y. Lan, and B. C. Wong. 2004. *Helicobacter pylori* infection is associated with increased expression of macrophage migratory inhibitory factor--by epithelial cells, T cells, and macrophages--in gastric mucosa. *J Infect Dis* 190: 293-302.
 87. Di Tommaso, A., Z. Xiang, M. Bugnoli, P. Pileri, N. Figura, P. F. Bayeli, R. Rappuoli, S. Abrignani, and M. T. De Magistris. 1995. *Helicobacter pylori*-specific CD4⁺ T-cell clones from peripheral blood and gastric biopsies. *Infect Immun* 63: 1102-1106.
 88. D'Ellos, M. M., M. Manghetti, F. Almerigogna, A. Amedei, F. Costa, D. Burrone, C. T. Baldari, S. Romagnani, J. L. Telford, and G. Del Prete. 1997. Different cytokine profile and antigen-specificity repertoire in *Helicobacter pylori*-specific T cell clones from the antrum of chronic gastritis patients with or without peptic ulcer. *Eur J Immunol* 27: 1751-1755.
 89. Zhu, J., H. Yamane, and W. E. Paul. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28: 445-489.
 90. Smythies, L. E., K. B. Waites, J. R. Lindsey, P. R. Harris, P. Ghiara, and P. D. Smith. 2000. *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice. *J Immunol* 165: 1022-1029.
 91. Sommer, F., G. Faller, P. Konturek, T. Kirchner, E. G. Hahn, J. Zeus, M. Rollinghoff, and M. Lohoff. 1998. Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4(+) lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype. *Infect Immun* 66: 5543-5546.
 92. Dallegri, F., and L. Ottonello. 1997. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res* 46: 382-391.
 93. Moss, S. F., and S. Sood. 2003. *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Infect Dis* 16: 445-451.
 94. Dixon, M. F., R. M. Genta, J. H. Yardley, and P. Correa. 1996. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 20: 1161-1181.
 95. Calame, K. L. 2001. Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat Immunol* 2: 1103-1108.
 96. Porter, R. R., and K. B. Reid. 1979. Activation of the complement system by antibody-antigen complexes: the classical pathway. *Adv Protein Chem* 33: 1-71.
 97. Wyatt, J. I., and B. J. Rathbone. 1988. Immune response of the gastric mucosa to *Campylobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol Suppl* 142: 44-49.
 98. Mattsson, A., M. Quiding-Jarbrink, H. Lonroth, A. Hamlet, I. Ahlstedt, and A. Svennerholm. 1998. Antibody-secreting cells in the stomachs of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect Immun* 66: 2705-2712.
 99. Perez-Perez, G. I., R. M. Peek, Jr., J. C. Atherton, M. J. Blaser, and T. L. Cover. 1999. Detection of anti-VacA antibody responses in serum and gastric juice samples using type s1/m1 and s2/m2 *Helicobacter pylori* VacA antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 489-493.
 100. Blanchard, T. G., J. G. Nedrud, and S. J. Czinn. 1999. Local and systemic antibody responses in humans with *Helicobacter pylori* infection. *Can J Gastroenterol* 13: 591-594.

101. Ermak, T. H., P. J. Giannasca, R. Nichols, G. A. Myers, J. Nedrud, R. Weltzin, C. K. Lee, H. Kleanthous, and T. P. Monath. 1998. Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J Exp Med* 188: 2277-2288.
102. Pappo, J., D. Torrey, L. Castriotta, A. Savinainen, Z. Kabok, and A. Ibraghimov. 1999. *Helicobacter pylori* infection in immunized mice lacking major histocompatibility complex class I and class II functions. *Infect Immun* 67: 337-341.
103. Bogstedt, A. K., S. Nava, T. Wadstrom, and L. Hammarstrom. 1996. *Helicobacter pylori* infections in IgA deficiency: lack of role for the secretory immune system. *Clin Exp Immunol* 105: 202-204.
104. Blanchard, T. G., S. J. Czinn, R. W. Redline, N. Sigmund, G. Harriman, and J. G. Nedrud. 1999. Antibody-independent protective mucosal immunity to gastric *helicobacter* infection in mice. *Cell Immunol* 191: 74-80.
105. Negrini, R., A. Savio, and B. J. Appelmelk. 1997. Autoantibodies to gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2 Suppl 1: S13-16.
106. D'Elis, M. M., B. J. Appelmelk, A. Amedei, M. P. Bergman, and G. Del Prete. 2004. Gastric autoimmunity: the role of *Helicobacter pylori* and molecular mimicry. *Trends Mol Med* 10: 316-323.
107. Amedei, A., M. P. Bergman, B. J. Appelmelk, A. Azzurri, M. Benagiano, C. Tamburini, R. van der Zee, J. L. Telford, C. M. Vandenbroucke-Grauls, M. M. D'Elis, and G. Del Prete. 2003. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* antigens and H⁺, K⁺ -- adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity. *J Exp Med* 198: 1147-1156.
108. D'Elis, M. M., A. Amedei, M. Manghetti, F. Costa, C. T. Baldari, A. S. Quazi, J. L. Telford, S. Romagnani, and G. Del Prete. 1999. Impaired T-cell regulation of B-cell growth in *Helicobacter pylori*--related gastric low-grade MALT lymphoma. *Gastroenterology* 117: 1105-1112.
109. Mannick, E. E., L. E. Bravo, G. Zarama, J. L. Realpe, X. J. Zhang, B. Ruiz, E. T. Fontham, R. Mera, M. J. Miller, and P. Correa. 1996. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res* 56: 3238-3243.
110. Fu, S., K. S. Ramanujam, A. Wong, G. T. Fantry, C. B. Drachenberg, S. P. James, S. J. Meltzer, and K. T. Wilson. 1999. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology* 116: 1319-1329.
111. Forstermann, U., and W. C. Sessa. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33: 829-837, 837a-837d.
112. Forstermann, U., E. I. Closs, J. S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath, and H. Kleinert. 1994. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23: 1121-1131.
113. Thomas, D. D., L. A. Ridnour, J. S. Isenberg, W. Flores-Santana, C. H. Switzer, S. Donzelli, P. Hussain, C. Vecoli, N. Paolocci, S. Ambs, C. A. Colton, C. C. Harris, D. D. Roberts, and D. A. Wink. 2008. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 45: 18-31.
114. Vanderwinden, J. M. 1994. Role of nitric oxide in gastrointestinal function and disease. *Acta Gastroenterol Belg* 57: 224-229.
115. Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907-916.
116. Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15: 749-795.
117. Alderton, W. K., C. E. Cooper, and R. G. Knowles. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal* 357: 593-615.

118. Kilbourn, R. G., and P. Belloni. 1990. Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. *J Natl Cancer Inst* 82: 772-776.
119. MacMicking, J., Q. W. Xie, and C. Nathan. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15: 323-350.
120. Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6: 3051-3064.
121. Aktan, F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life sciences* 75: 639-653.
122. Hibbs, J. B., Jr., R. R. Taintor, and Z. Vavrin. 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235: 473-476.
123. Serbina, N. V., T. P. Salazar-Mather, C. A. Biron, W. A. Kuziel, and E. G. Pamer. 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19: 59-70.
124. Tezuka, H., Y. Abe, M. Iwata, H. Takeuchi, H. Ishikawa, M. Matsushita, T. Shiohara, S. Akira, and T. Ohteki. 2007. Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* 448: 929-933.
125. McCall, T. B., R. M. Palmer, and S. Moncada. 1991. Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. *Eur J Immunol* 21: 2523-2527.
126. Salvucci, O., J. P. Kolb, B. Dugas, N. Dugas, and S. Chouaib. 1998. The induction of nitric oxide by interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha in human natural killer cells: relationship with the regulation of lytic activity. *Blood* 92: 2093-2102.
127. Kim, J. M., J. S. Kim, H. C. Jung, I. S. Song, and C. Y. Kim. 2002. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide in *Helicobacter pylori*-infected human gastric epithelial cells: possible role of interferon-gamma in polarized nitric oxide secretion. *Helicobacter* 7: 116-128.
128. Choudhari, S. K., M. Chaudhary, S. Bagde, A. R. Gadgil, and V. Joshi. 2013. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol* 11: 118.
129. Gobert, A. P., D. J. McGee, M. Akhtar, G. L. Mendz, J. C. Newton, Y. Cheng, H. L. Mobley, and K. T. Wilson. 2001. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13844-13849.
130. van Den Brink, G. R., F. J. ten Kate, C. Y. Ponsioen, M. M. Rive, G. N. Tytgat, S. J. van Deventer, and M. P. Peppelenbosch. 2000. Expression and activation of NF-kappa B in the antrum of the human stomach. *J Immunol* 164: 3353-3359.
131. Salgo, M. G., G. L. Squadrito, and W. A. Pryor. 1995. Peroxynitrite causes apoptosis in rat thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 1111-1118.
132. Loweth, A. C., G. T. Williams, J. H. Scarpello, and N. G. Morgan. 1997. Evidence for the involvement of cGMP and protein kinase G in nitric oxide-induced apoptosis in the pancreatic B-cell line, HIT-T15. *FEBS Lett* 400: 285-288.
133. Naito, Y., T. Takagi, H. Okada, Y. Nukigi, K. Uchiyama, M. Kuroda, O. Handa, S. Kokura, N. Yagi, Y. Kato, T. Osawa, and T. Yoshikawa. 2008. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide-modified proteins in *Helicobacter pylori*-associated atrophic gastric mucosa. *J Gastroenterol Hepatol* 23 Suppl 2: S250-257.
134. Calmels, S., P. Hainaut, and H. Ohshima. 1997. Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* 57: 3365-3369.

135. Li, H. L., B. Z. Sun, and F. C. Ma. 2004. Expression of COX-2, iNOS, p53 and Ki-67 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *World J Gastroenterol* 10: 1862-1866.
136. Rajewsky, K. 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381: 751-758.
137. Edelman, G. M., B. A. Cunningham, W. E. Gall, P. D. Gottlieb, U. Rutishauser, and M. J. Waxdal. 2004. The covalent structure of an entire gamma G immunoglobulin molecule. 1969. *J Immunol* 173: 5335-5342.
138. Ramsland, P. A., and W. Farrugia. 2002. Crystal structures of human antibodies: a detailed and unfinished tapestry of immunoglobulin gene products. *J Mol Recognit* 15: 248-259.
139. Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. J. Shlomchik. 2002. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
140. Reth, M. 1992. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 10: 97-121.
141. Lansford, R., A. Okada, J. Chen, E. M. Oltz, T. K. Blackwell, F. W. Alt, and G. Rathbun. 1995. *Mechanism and control of immunoglobulin gene rearrangement*. IRL Press, Molecular Immunology, Oxford.
142. Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575-581.
143. Hozumi, N., and S. Tonegawa. 2004. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. 1976 [classical article]. *J Immunol* 173: 4260-4264.
144. Corcoran, A. E. 2005. Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin Immunol* 17: 141-154.
145. Croce, C. M., M. Shander, J. Martinis, L. Cicurel, G. G. D'Ancona, T. W. Dolby, and H. Koprowski. 1979. Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 3416-3419.
146. Matsuda, F., K. Ishii, P. Bourvagnet, K. Kuma, H. Hayashida, T. Miyata, and T. Honjo. 1998. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med* 188: 2151-2162.
147. Ravetch, J. V., U. Siebenlist, S. Korsmeyer, T. Waldmann, and P. Leder. 1981. Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell* 27: 583-591.
148. Corbett, S. J., I. M. Tomlinson, E. L. Sonnhhammer, D. Buck, and G. Winter. 1997. Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination. *J Mol Biol* 270: 587-597.
149. Lefranc, M. P. 2001. Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes. *Exp Clin Immunogenet* 18: 242-254.
150. Lefranc, M. P. 2001. Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes. *Exp Clin Immunogenet* 18: 161-174.
151. Fugmann, S. D., A. I. Lee, P. E. Shockett, I. J. Villey, and D. G. Schatz. 2000. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol* 18: 495-527.
152. Gellert, M. 2002. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* 71: 101-132.
153. Lewis, S. M. 1994. P nucleotides, hairpin DNA and V(D)J joining: making the connection. *Semin Immunol* 6: 131-141.
154. Lewis, S. M. 1994. The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv Immunol* 56: 27-150.
155. Grawunder, U., R. B. West, and M. R. Lieber. 1998. Antigen receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol* 10: 172-180.

156. van Gent, D. C., D. A. Ramsden, and M. Gellert. 1996. The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. *Cell* 85: 107-113.
157. Gauss, G. H., and M. R. Lieber. 1996. Mechanistic constraints on diversity in human V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* 16: 258-269.
158. Agard, E. A., and S. M. Lewis. 2000. Postcleavage sequence specificity in V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* 20: 5032-5040.
159. Hartley, S. B., M. P. Cooke, D. A. Fulcher, A. W. Harris, S. Cory, A. Basten, and C. C. Goodnow. 1993. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 72: 325-335.
160. Pike, B. L., A. W. Boyd, and G. J. Nossal. 1982. Clonal anergy: the universally anergic B lymphocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 2013-2017.
161. Goodnow, C. C., J. Crosbie, S. Adelstein, T. B. Lavoie, S. J. Smith-Gill, R. A. Brink, H. Pritchard-Briscoe, J. S. Wotherspoon, R. H. Loblay, K. Raphael, and et al. 1988. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334: 676-682.
162. Tiegs, S. L., D. M. Russell, and D. Nemazee. 1993. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 177: 1009-1020.
163. Carsetti, R., G. Kohler, and M. C. Lamers. 1995. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med* 181: 2129-2140.
164. Wabl, M., M. Cascalho, and C. Steinberg. 1999. Hypermutation in antibody affinity maturation. *Curr Opin Immunol* 11: 186-189.
165. Goossens, T., U. Klein, and R. Kuppers. 1998. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2463-2468.
166. Allen, C. D., T. Okada, H. L. Tang, and J. G. Cyster. 2007. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* 315: 528-531.
167. Tew, J. G., J. Wu, D. Qin, S. Helm, G. F. Burton, and A. K. Szakal. 1997. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol Rev* 156: 39-52.
168. Stavnezer, J., J. E. Guikema, and C. E. Schrader. 2008. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 26: 261-292.
169. Neumann, L., M. Mueller, V. Moos, F. Heller, T. F. Meyer, C. Loddenkemper, C. Bojarski, M. Fehlings, T. Doerner, K. Allers, T. Aebischer, R. Ignatius, and T. Schneider. 2016. Mucosal Inducible NO Synthase-Producing IgA+ Plasma Cells in *Helicobacter pylori*-Infected Patients. *J Immunol* 197: 1801-1808.
170. Mueller, M. 2014. Immunohistological characterization of iNOS expressing immune cells in context of *Helicobacter pylori* infection. In *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I Institut für Biologie* Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany.
171. Hammadi, A., C. Billard, A. M. Faussat, and J. P. Kolb. 2008. Stimulation of iNOS expression and apoptosis resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells through engagement of Toll-like receptor 7 (TLR-7) and NF-kappaB activation. *Nitric Oxide* 19: 138-145.
172. Zhao, H., N. Dugas, C. Mathiot, A. Delmer, B. Dugas, F. Sigaux, and J. P. Kolb. 1998. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a functional inducible nitric oxide synthase displaying anti-apoptotic activity. *Blood* 92: 1031-1043.
173. Murad, F. 1999. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep* 19: 133-154.
174. Ignarro, L. J. 1990. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 16: 477-483.

175. Pautz, A., J. Art, S. Hahn, S. Nowag, C. Voss, and H. Kleinert. 2010. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23: 75-93.
176. Saini, A. S., G. N. Shenoy, S. Rath, V. Bal, and A. George. 2014. Inducible nitric oxide synthase is a major intermediate in signaling pathways for the survival of plasma cells. *Nat Immunol* 15: 275-282.
177. Fritz, J. H., O. L. Rojas, N. Simard, D. D. McCarthy, S. Hapfelmeier, S. Rubino, S. J. Robertson, M. Larijani, J. Gosselin, Ivanov, II, A. Martin, R. Casellas, D. J. Philpott, S. E. Girardin, K. D. McCoy, A. J. Macpherson, C. J. Paige, and J. L. Gommerman. 2012. Acquisition of a multifunctional IgA⁺ plasma cell phenotype in the gut. *Nature* 481: 199-203.
178. Tiller, T., E. Meffre, S. Yurasov, M. Tsuiji, M. C. Nussenzweig, and H. Wardemann. 2008. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods* 329: 112-124.
179. Campbell, M. J., A. D. Zelenetz, S. Levy, and R. Levy. 1992. Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire. *Mol Immunol* 29: 193-203.
180. Thoree, V. C., S. J. Golby, L. Boursier, M. Hackett, D. K. Dunn-Walters, J. D. Sanderson, and J. Spencer. 2002. Related IgA1 and IgG producing cells in blood and diseased mucosa in ulcerative colitis. *Gut* 51: 44-50.
181. Marks, J. D., M. Tristem, A. Karpas, and G. Winter. 1991. Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes. *Eur J Immunol* 21: 985-991.
182. Fischer, W., L. Windhager, S. Rohrer, M. Zeiller, A. Karnholz, R. Hoffmann, R. Zimmer, and R. Haas. 2010. Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res* 38: 6089-6101.
183. Shacklett, B. L., O. Yang, M. A. Hausner, J. Elliott, L. Hultin, C. Price, M. Fuerst, J. Matud, P. Hultin, C. Cox, J. Ibarrondo, J. T. Wong, D. F. Nixon, P. A. Anton, and B. D. Jamieson. 2003. Optimization of methods to assess human mucosal T-cell responses to HIV infection. *J Immunol Methods* 279: 17-31.
184. Cortese-Krott, M. M., A. Rodriguez-Mateos, G. G. Kuhnle, G. Brown, M. Feelisch, and M. Kelm. 2012. A multilevel analytical approach for detection and visualization of intracellular NO production and nitrosation events using diaminofluoresceins. *Free Radic Biol Med* 53: 2146-2158.
185. Nagano, T. 1999. Practical methods for detection of nitric oxide. *Luminescence* 14: 283-290.
186. Kabat, E. A. 1991. *Sequences of proteins of immunological interest. [Vol 1]*. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health.
187. Wardemann, H., S. Yurasov, A. Schaefer, J. W. Young, E. Meffre, and M. C. Nussenzweig. 2003. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301: 1374-1377.
188. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
189. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
190. Bhuiyan, T. R., F. Qadri, P. K. Bardhan, M. M. Ahmad, B. Kindlund, A. M. Svennerholm, and A. Lundgren. 2008. Comparison of mucosal B- and T-cell responses in *Helicobacter pylori*-infected subjects in a developing and a developed country. *FEMS Immunol Med Microbiol* 54: 70-79.

191. Klein, U., K. Rajewsky, and R. Kuppers. 1998. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188: 1679-1689.
192. Agematsu, K. 2000. Memory B cells and CD27. *Histol Histopathol* 15: 573-576.
193. Thomas, L. 1992. *Labor und Diagnose*. MVG, Marburg
194. Carter, K. L., E. Cahir-McFarland, and E. Kieff. 2002. Epstein-barr virus-induced changes in B-lymphocyte gene expression. *J Virol* 76: 10427-10436.
195. Wroblewski, J. M., A. Copple, L. P. Batson, C. D. Landers, and J. R. Yannelli. 2002. Cell surface phenotyping and cytokine production of Epstein-Barr Virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines (LCLs). *J Immunol Methods* 264: 19-28.
196. Hur, D. Y., M. H. Lee, J. W. Kim, J. H. Kim, Y. K. Shin, J. K. Rho, K. B. Kwack, W. J. Lee, and B. G. Han. 2005. CD19 signalling improves the Epstein-Barr virus-induced immortalization of human B cell. *Cell Prolif* 38: 35-45.
197. Mannick, J. B., K. Asano, K. Izumi, E. Kieff, and J. S. Stamler. 1994. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 79: 1137-1146.
198. Pistoia, V., F. Cozzolino, A. Rubartelli, M. Torcia, S. Roncella, and M. Ferrarini. 1986. In vitro production of interleukin 1 by normal and malignant human B lymphocytes. *J Immunol* 136: 1688-1692.
199. Rochford, R., M. J. Cannon, R. E. Sabbe, K. Adusumilli, G. Picchio, J. M. Glynn, D. J. Noonan, D. E. Mosier, and M. V. Hobbs. 1997. Common and idiosyncratic patterns of cytokine gene expression by Epstein-Barr virus transformed human B cell lines. *Viral Immunol* 10: 183-195.
200. Hutchins, D., B. B. Cohen, and C. M. Steel. 1990. Production and regulation of interleukin 6 in human B lymphoid cells. *Eur J Immunol* 20: 961-968.
201. Sung, S. S., L. K. Jung, J. A. Walters, W. Chen, C. Y. Wang, and S. M. Fu. 1988. Production of tumor necrosis factor/cachectin by human B cell lines and tonsillar B cells. *J Exp Med* 168: 1539-1551.
202. Burdin, N., C. Peronne, J. Banchereau, and F. Rousset. 1993. Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. *J Exp Med* 177: 295-304.
203. Miyauchi, K., E. Urano, H. Yoshiyama, and J. Komano. 2011. Cytokine signatures of transformed B cells with distinct Epstein-Barr virus latencies as a potential diagnostic tool for B cell lymphoma. *Cancer Sci* 102: 1236-1241.
204. Benckert, J., N. Schmolka, C. Kreschel, M. J. Zoller, A. Sturm, B. Wiedenmann, and H. Wardemann. 2011. The majority of intestinal IgA+ and IgG+ plasmablasts in the human gut are antigen-specific. *J Clin Invest* 121: 1946-1955.
205. Smith, K. G., A. Light, G. J. Nossal, and D. M. Tarlinton. 1997. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *EMBO J* 16: 2996-3006.
206. Kaartinen, M., G. M. Griffiths, A. F. Markham, and C. Milstein. 1983. mRNA sequences define an unusually restricted IgG response to 2-phenyloxazolone and its early diversification. *Nature* 304: 320-324.
207. Andersen, P. S., M. Haahr-Hansen, V. W. Coljee, F. R. Hinnerfeldt, K. Varming, S. Bregenholt, and J. S. Haurum. 2007. Extensive restrictions in the VH sequence usage of the human antibody response against the Rhesus D antigen. *Mol Immunol* 44: 412-422.
208. Adderson, E. E., P. G. Shackelford, A. Quinn, P. M. Wilson, M. W. Cunningham, R. A. Insel, and W. L. Carroll. 1993. Restricted immunoglobulin VH usage and VDJ combinations in the human response to Haemophilus influenzae type b capsular

- polysaccharide. Nucleotide sequences of monospecific anti-Haemophilus antibodies and polyspecific antibodies cross-reacting with self antigens. *J Clin Invest* 91: 2734-2743.
209. Frolich, D., C. Giesecke, H. E. Mei, K. Reiter, C. Daridon, P. E. Lipsky, and T. Dorner. 2010. Secondary immunization generates clonally related antigen-specific plasma cells and memory B cells. *J Immunol* 185: 3103-3110.
 210. Macpherson, A. J., D. Gatto, E. Sainsbury, G. R. Harriman, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 2000. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288: 2222-2226.
 211. Bos, N. A., J. C. Bun, S. H. Popma, E. R. Cebra, G. J. Deenen, M. J. van der Cammen, F. G. Kroese, and J. J. Cebra. 1996. Monoclonal immunoglobulin A derived from peritoneal B cells is encoded by both germ line and somatically mutated VH genes and is reactive with commensal bacteria. *Infect Immun* 64: 616-623.
 212. Nunokawa, Y., N. Ishida, and S. Tanaka. 1994. Promoter analysis of human inducible nitric oxide synthase gene associated with cardiovascular homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 802-807.
 213. Chartrain, N. A., D. A. Geller, P. P. Koty, N. F. Sitrin, A. K. Nussler, E. P. Hoffman, T. R. Billiar, N. I. Hutchinson, and J. S. Mudgett. 1994. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 269: 6765-6772.
 214. Du, Q., X. Zhang, J. Cardinal, Z. Cao, Z. Guo, L. Shao, and D. A. Geller. 2009. Wnt/beta-catenin signaling regulates cytokine-induced human inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting nuclear factor-kappaB activation in cancer cells. *Cancer Res* 69: 3764-3771.
 215. Chu, S. C., J. Marks-Konczalik, H. P. Wu, T. C. Banks, and J. Moss. 1998. Analysis of the cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: characterization of differences between human and mouse iNOS promoters. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 871-878.
 216. Marks-Konczalik, J., S. C. Chu, and J. Moss. 1998. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites. *J Biol Chem* 273: 22201-22208.
 217. Pellicano, A., L. Sebkova, G. Monteleone, G. Guarnieri, M. Imeneo, F. Pallone, and F. Luzzza. 2007. Interleukin-12 drives the Th1 signaling pathway in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa. *Infect Immun* 75: 1738-1744.
 218. Harris, D. P., S. Goodrich, K. Mohrs, M. Mohrs, and F. E. Lund. 2005. Cutting edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. *J Immunol* 175: 7103-7107.
 219. Shen, P., and S. Fillatreau. 2015. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nat Rev Immunol* 15: 441-451.
 220. Yang, L., K. Yamamoto, S. Nishiumi, M. Nakamura, H. Matsui, S. Takahashi, T. Dohi, T. Okada, K. Kakimoto, N. Hoshi, M. Yoshida, and T. Azuma. 2015. Interferon-gamma-producing B cells induce the formation of gastric lymphoid follicles after Helicobacter suis infection. *Mucosal Immunol* 8: 279-295.
 221. Forrester, K., S. Ambs, S. E. Lupold, R. B. Kapust, E. A. Spillare, W. C. Weinberg, E. Felley-Bosco, X. W. Wang, D. A. Geller, E. Tzeng, T. R. Billiar, and C. C. Harris. 1996. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2442-2447.
 222. Cassese, G., S. Arce, A. E. Hauser, K. Lehnert, B. Moewes, M. Mostarac, G. Muehlinghaus, M. Szyska, A. Radbruch, and R. A. Manz. 2003. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol* 171: 1684-1690.

223. Sheh, A., C. W. Lee, K. Masumura, B. H. Rickman, T. Nohmi, G. N. Wogan, J. G. Fox, and D. B. Schauer. 2010. Mutagenic potency of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of mice is determined by sex and duration of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15217-15222.
224. Cianchi, F., C. Cortesini, O. Fantappie, L. Messerini, N. Schiavone, A. Vannacci, S. Nistri, I. Sardi, G. Baroni, C. Marzocca, F. Perna, R. Mazzanti, P. Bechi, and E. Masini. 2003. Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer: correlation with tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 162: 793-801.
225. Chen, C. N., F. J. Hsieh, Y. M. Cheng, K. J. Chang, and P. H. Lee. 2006. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer. *J Surg Oncol* 94: 226-233.
226. Song, Z. J., P. Gong, and Y. E. Wu. 2002. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 8: 591-595.
227. Rafiei, A., V. Hosseini, G. Janbabai, B. Fazli, A. Ajami, Z. Hosseini-Khah, J. Gilbreath, and D. S. Merrell. 2012. Inducible nitric oxide synthetase genotype and *Helicobacter pylori* infection affect gastric cancer risk. *World J Gastroenterol* 18: 4917-4924.
228. Goto, Y., T. Ando, M. Naito, H. Goto, and N. Hamajima. 2006. Inducible nitric oxide synthase polymorphism is associated with the increased risk of differentiated gastric cancer in a Japanese population. *World J Gastroenterol* 12: 6361-6365.
229. Kett, K., P. Brandtzaeg, J. Radl, and J. J. Haaijman. 1986. Different subclass distribution of IgA-producing cells in human lymphoid organs and various secretory tissues. *J Immunol* 136: 3631-3635.
230. Berstad, A. E., M. Kilian, K. N. Valnes, and P. Brandtzaeg. 1999. Increased mucosal production of monomeric IgA1 but no IgA1 protease activity in *Helicobacter pylori* gastritis. *Am J Pathol* 155: 1097-1104.
231. Crago, S. S., W. H. Kutteh, I. Moro, M. R. Allansmith, J. Radl, J. J. Haaijman, and J. Mestecky. 1984. Distribution of IgA1-, IgA2-, and J chain-containing cells in human tissues. *J Immunol* 132: 16-18.
232. Lin, M., L. Du, P. Brandtzaeg, and Q. Pan-Hammarstrom. 2014. IgA subclass switch recombination in human mucosal and systemic immune compartments. *Mucosal Immunol* 7: 511-520.
233. Mattu, T. S., R. J. Pleass, A. C. Willis, M. Kilian, M. R. Wormald, A. C. Lellouch, P. M. Rudd, J. M. Woof, and R. A. Dwek. 1998. The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc α receptor interactions. *J Biol Chem* 273: 2260-2272.
234. Kaetzel, C. S. 2007. *Mucosal Immune Defense: Immunoglobulin A*. Springer Science+Business Media, LLC New York, USA.
235. Russell, M. W., C. Lue, A. W. van den Wall Bake, Z. Moldoveanu, and J. Mestecky. 1992. Molecular heterogeneity of human IgA antibodies during an immune response. *Clin Exp Immunol* 87: 1-6.
236. Mestecky, J., and M. W. Russell. 1986. IgA subclasses. *Monogr Allergy* 19: 277-301.
237. Kett, K., K. Baklien, A. Bakken, J. G. Kral, O. Fausa, and P. Brandtzaeg. 1995. Intestinal B-cell isotype response in relation to local bacterial load: evidence for immunoglobulin A subclass adaptation. *Gastroenterology* 109: 819-825.
238. Macpherson, A. J. 2006. IgA adaptation to the presence of commensal bacteria in the intestine. *Current topics in microbiology and immunology* 308: 117-136.
239. He, B., W. Xu, P. A. Santini, A. D. Polydorides, A. Chiu, J. Estrella, M. Shan, A. Chadburn, V. Villanacci, A. Plebani, D. M. Knowles, M. Rescigno, and A. Cerutti. 2007. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 26: 812-826.

240. Senior, B. W., J. I. Dunlop, M. R. Batten, M. Kilian, and J. M. Woof. 2000. Cleavage of a recombinant human immunoglobulin A2 (IgA2)-IgA1 hybrid antibody by certain bacterial IgA1 proteases. *Infect Immun* 68: 463-469.
241. Yavuz, S., A. C. Grammer, A. S. Yavuz, T. Nanki, and P. E. Lipsky. 2001. Comparative characteristics of mu chain and alpha chain transcripts expressed by individual tonsil plasma cells. *Mol Immunol* 38: 19-34.
242. Briney, B. S., J. R. Willis, J. A. Finn, B. A. McKinney, and J. E. Crowe, Jr. 2014. Tissue-specific expressed antibody variable gene repertoires. *PLoS One* 9: e100839.
243. Briney, B. S., J. R. Willis, B. A. McKinney, and J. E. Crowe, Jr. 2012. High-throughput antibody sequencing reveals genetic evidence of global regulation of the naive and memory repertoires that extends across individuals. *Genes Immun* 13: 469-473.
244. Wu, Y. C., D. Kipling, H. S. Leong, V. Martin, A. A. Ademokun, and D. K. Dunn-Walters. 2010. High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations. *Blood* 116: 1070-1078.
245. Brezinschek, H. P., S. J. Foster, R. I. Brezinschek, T. Dorner, R. Domiati-Saad, and P. E. Lipsky. 1997. Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J Clin Invest* 99: 2488-2501.
246. Brezinschek, H. P., R. I. Brezinschek, and P. E. Lipsky. 1995. Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J Immunol* 155: 190-202.
247. Bende, R. J., W. M. Aarts, R. G. Riedl, D. de Jong, S. T. Pals, and C. J. van Noesel. 2005. Among B cell non-Hodgkin's lymphomas, MALT lymphomas express a unique antibody repertoire with frequent rheumatoid factor reactivity. *J Exp Med* 201: 1229-1241.
248. Michaeli, M., H. Tabibian-Keissar, G. Schiby, G. Shahaf, Y. Pickman, L. Hazanov, K. Rosenblatt, D. K. Dunn-Walters, I. Barshack, and R. Mehr. 2014. Immunoglobulin gene repertoire diversification and selection in the stomach - from gastritis to gastric lymphomas. *Front Immunol* 5: 264.
249. Matsuda, F., E. K. Shin, H. Nagaoka, R. Matsumura, M. Haino, Y. Fukita, S. Taka-ishi, T. Imai, J. H. Riley, R. Anand, and et al. 1993. Structure and physical map of 64 variable segments in the 3'0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Nat Genet* 3: 88-94.
250. Schroeder, H. W., Jr., and J. Y. Wang. 1990. Preferential utilization of conserved immunoglobulin heavy chain variable gene segments during human fetal life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6146-6150.
251. Ernst, P. B., and B. D. Gold. 2000. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* 54: 615-640.
252. Klein, U., and R. Dalla-Favera. 2008. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8: 22-33.
253. Yamasaki, R., K. Yokota, H. Okada, S. Hayashi, M. Mizuno, T. Yoshino, Y. Hirai, D. Saitou, T. Akagi, and K. Oguma. 2004. Immune response in *Helicobacter pylori*-induced low-grade gastric-mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *J Med Microbiol* 53: 21-29.
254. Ferrand, J., D. Roumanes, V. Pitard, J. F. Moreau, F. Megraud, and P. Lehours. 2008. Modulation of lymphocyte proliferation induced by gastric MALT lymphoma-associated *Helicobacter pylori* strains. *Helicobacter* 13: 167-173.

- 255. Lee, M. R., G. Y. Seo, Y. M. Kim, and P. H. Kim. 2011. iNOS potentiates mouse Ig isotype switching through AID expression. *Biochem Biophys Res Commun* 410: 602-607.
- 256. O'Rourke, J. L., and A. Lee. 2003. Animal models of *Helicobacter pylori* infection and disease. *Microbes Infect* 5: 741-748.
- 257. Pritchard, D. M., and S. M. Przemack. 2004. Review article: How useful are the rodent animal models of gastric adenocarcinoma? *Aliment Pharmacol Ther* 19: 841-859.
- 258. Gorrell, R. J., O. L. Wijburg, J. S. Pedersen, A. K. Walduck, T. Kwok, R. A. Strugnell, and R. M. Robins-Browne. 2013. Contribution of secretory antibodies to intestinal mucosal immunity against *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 81: 3880-3893.
- 259. Akhiani, A. A., A. Stensson, K. Schon, and N. Y. Lycke. 2005. IgA antibodies impair resistance against *Helicobacter pylori* infection: studies on immune evasion in IL-10-deficient mice. *J Immunol* 174: 8144-8153.

8. ANHANG

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1 Schema der Immunantwort auf <i>H. pylori</i> und der Pathogenese der Infektionen	11
Abbildung 3-2 Schematische Struktur eines Immunglobulinmonomers	16
Abbildung 3-3 Schematische Darstellung der Prozesse der VDJ-Rekombination des Lokus für schwere Immunglobulinketten	20
Abbildung 3-4 Mechanismus des Isotyp-Wechsels am Beispiel IgA1	22
Abbildung 3-5 Erhöhte Anzahl von iNOS ⁺ Plasmazellen in der Magenmukosa von Individuen, die eine experimentelle <i>H. pylori</i> -Infektion eradizieren konnten	24
Abbildung 4-1 Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbemethoden von Dako	42
Abbildung 4-2 Schematische Darstellung der Zellpopulationen im FSC/SSC-Dot Plot	43
Abbildung 4-3 Schematische Darstellung der iNOS ⁺ bzw. iNOS ⁻ Plasmazell-Isolierung mittels FACS und der Einzelzell-PCR Methode für die Amplifizierung der spezifischen IgH-Kette	48
Abbildung 5-1 Repräsentative <i>Gating</i> -Strategie für die Analyse der LPL und PBMC hinsichtlich B-Zellsubtypen mittels Durchflusszytometrie	59
Abbildung 5-2 Verteilung CD19 ⁺ B-Zellen in der Magenmukosa und Blut von <i>H. pylori</i> -Patienten und Kontrollen	60
Abbildung 5-3 Verteilung CD19 ⁺ B-Zellsubtypen in der Magenmukosa und Blut von <i>H. pylori</i> -Patienten und Kontrollen	61
Abbildung 5-4 Konzentrationen von IgM, IgA und Gesamt-IgG im Serum und Biopsieüberständen der Magenmukosa <i>H. pylori</i> -infizierter Patienten und Kontrollen	62
Abbildung 5-5 Nachweis <i>H. pylori</i> -spezifischer IgGs im humanen Serum und Biopsieüberständen der Magenmukosa von <i>H. pylori</i> -infizierten Patienten und Kontrollen	63
Abbildung 5-6 Verteilung und Analyse iNOS ⁺ Plasmazellen in der Magenmukosa von <i>H. pylori</i> -Patienten und Kontrollen	64
Abbildung 5-7 Nachweis NO-produzierender Plasmazellen in <i>H. pylori</i> -infizierten Patienten	65
Abbildung 5-8 Mukosale iNOS ⁺ Plasmazellen wurden nicht in duodenalen Biopsaten von <i>T. whipplei</i> -, HIV- oder <i>G. duodenalis</i> -infizierten Patienten detektiert	66
Abbildung 5-9 iNOS-exprimierende B-LZL sind stark aktiviert und produzieren IFN- γ	67
Abbildung 5-10 Konzentrationen pro- und anti-inflammatorischer Zytokine im Serum und Biopsieüberständen <i>H. pylori</i> -infizierter Patienten und Kontrollen	68
Abbildung 5-11 <i>H. pylori</i> -infizierte Patienten produzieren eine höhere Menge an mRNA pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in mukosalen als in peripheren <i>memory</i> B-Zellen	69

Abbildung 5-12 Zytokin-Expression mukosaler <i>memory</i> B-Zellen aus <i>H. pylori</i> -infizierten Patienten	70
Abbildung 5-13 Zytokin-Expression mukosaler Plasmazellen aus <i>H. pylori</i> -infizierten Patienten	70
Abbildung 5-14 <i>Gating</i> -Strategie zur Sortierung DAF-FM ⁻ und DAF-FM ⁺ Plasmazellen...	71
Abbildung 5-15 Verteilung der Immunglobulin-Subklassen mukosaler Plasmazellen aus drei <i>H. pylori</i> -infizierten Spendern.....	72
Abbildung 5-16 Verteilung der Immunglobulin-Subklassen mukosaler iNOS ⁻ bzw. iNOS ⁺ Plasmazellen von zwei <i>H. pylori</i> -infizierten Spendern.	73
Abbildung 5-17 V _H -Familien-Nutzung innerhalb der exprimierten variablen Region der schweren Immunglobulinketten mukosaler Plasmazellen aus drei <i>H. pylori</i> -Patienten	74
Abbildung 5-18 V _H -Gen-Nutzung innerhalb der exprimierten variablen Region der schweren Immunglobulinketten mukosaler Plasmazellen aus drei <i>H. pylori</i> -Patienten	74
Abbildung 5-19 J _H -Familien-Nutzung innerhalb der exprimierten variablen Region der schweren Immunglobulinketten mukosaler Plasmazellen aus drei <i>H. pylori</i> -Patienten	75
Abbildung 5-20 Nutzung der V _H - zu J _H -Familiensegment-Kombinationen mukosaler Plasmazellen von <i>H. pylori</i> -Patienten.	76
Abbildung 5-21 Nutzung der Kombinationen von V _H -Gensegmenten zu J _H -Familiensegmenten mukosaler Plasmazellen aus drei <i>H. pylori</i> -Patienten.....	77
Abbildung 5-22 Somatische Hypermutation innerhalb der V _H -Region mukosaler Plasmazellen aus drei <i>H. pylori</i> -Patienten.....	79
Abbildung 5-23 Somatische Hypermutationen innerhalb der V _H -Region mukosaler Plasmazellen aus drei <i>H. pylori</i> -Patienten unterschieden nach V _H -Familien	80
Abbildung 5-24 CDRH3 Sequenzlänge mukosaler Plasmazellen aus drei <i>H. pylori</i> -Patienten	82
Abbildung 5-25 Strategie zur Klonierung und Expression humaner monoklonaler Antikörper	85
Abbildung 5-26 IgG-Konzentrationen der gereinigten rekombinanten Antikörper einzelner mukosaler Plasmazellen von <i>H. pylori</i> -Patient HP2	87
Abbildung 5-27 SDS-Gel gereinigter rekombinanter monoklonaler humaner Antikörper unter denaturierenden Bedingungen.....	88
Abbildung 5-28 Detektierung <i>H. pylori</i> -spezifischer Antikörper mittels ELISA	89
Abbildung 5-29 Detektierung <i>H. pylori</i> -spezifischer Antikörper mittels Western-Blot.....	90
Abbildung 5-30 Detektierung polyreaktiver Antikörper mittels ELISA	91

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Ausschnitt von <i>H. pylori</i> Pathogenitätsfaktoren	9
Tabelle 4-1 Technische Geräte	27
Tabelle 4-2 Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 4-3 Chemikalien	28
Tabelle 4-4 Zusammensetzung von Puffern und Medien	30
Tabelle 4-5 Kommerzielle Komplettsysteme	31
Tabelle 4-6 Verwendete Antikörper in der Immunhistochemie	32
Tabelle 4-7 Verwendete Antikörper in der Durchflusszytometrie	32
Tabelle 4-8 Verwendete Isotyp-Kontrollantikörper in der Durchflusszytometrie	33
Tabelle 4-9 Verwendete Antikörper für ELISA	33
Tabelle 4-10 Primer für 'nested' PCR' der schweren Kette (IgH)	34
Tabelle 4-11 Primer für 'nested' PCR' der leichten Kette (Igκ)	35
Tabelle 4-12 Primer für 'nested' PCR' der leichten Kette (Igλ)	35
Tabelle 4-13 Primer für Kontroll-PCR nach Transformation	36
Tabelle 4-14 Zelllinien und relevante Eigenschaften	36
Tabelle 4-15 Bakterienstämme	36
Tabelle 4-16 Plasmide	36
Tabelle 4-17 Software	37
Tabelle 4-18 Patientenübersicht der verwendeten Proben	38
Tabelle 4-19 Übersicht der nachgewiesenen Zytokine und Immunglobulinklassen in Seren und Biopsie-Überständen	41
Tabelle 4-20 Protokollübersicht der nachgewiesenen Proteine in der Histochemie	42
Tabelle 4-22 Beispiel für Reaktionsmische von externer und interner PCR mit allen Vorwärts- und Rückwärtsprimern der schweren Kette	49
Tabelle 4-23 Beispiel für Reaktionsmische von externer und interner PCR mit allen Vorwärts- und Rückwärtsprimern der leichten Kette kappa	49
Tabelle 4-24 Beispiel für Reaktionsmische von externer und interner PCR mit allen Vorwärts- und Rückwärtsprimern der leichten Kette lambda	50
Tabelle 4-25 Reaktionsmix von einer spezifischen internen PCR	51
Tabelle 4-26 Ansätze für DNA-Verdau mit spezifischen Restriktionsenzymen	52
Tabelle 4-27 Reaktionsmix der Kontroll-PCR	53
Tabelle 5-1 Molekulare Eigenschaften der exprimierten IgH-Sequenzen der Plasmazellen (PZ) von <i>H. pylori</i> -Patienten	78

Tabelle 5-2 R/S-Verhältnisse der FWR- und CDRH-Regionen für die exprimierten IgH-Sequenzen der Plasmazellen der *H. pylori*-Patienten getrennt nach Immunglobulin-Isotypen 81

Tabelle 5-3 Molekulare Eigenschaften der klonal verwandten Plasmazellen (PZ) von *H. pylori*-Patienten 83

Tabelle 5-4 Molekulare Eigenschaften der erfolgreich klonierten variablen Regionen der Antikörper aus Plasmazellen (PZ) des Patienten HP2. 87

Eidestattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Laura Anne Neumann, dass die vorliegende Dissertation zum Thema:
„Die Charakterisierung von B-Zellen und Plasmazellen im Kontext einer chronischen
Helicobacter pylori-Infektion“ selbstständig verfasst wurde und keine anderen als die
angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Berlin, den

.....

Laura Anne Neumann